THIAGO GOMES DE FIGUEIREDO GONDIM

PROPOSTA NA UTILIZAÇÃO DE BIOPOLÍMERO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUPORTE NA DIFERENCIAÇÃO "*IN VITRO*" DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS EM QUERATINÓCITO

Recife

2012

THIAGO GOMES DE FIGUEIREDO GONDIM

PROPOSTA NA UTILIZAÇÃO DE BIOPOLÍMERO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUPORTE NA DIFERENCIAÇÃO "*IN VITRO*" DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS EM QUERATINÓCITO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora:
Profª. Drª. Paloma Lys de Medeiros
(Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Ciências Biológicas – UFPE).

Co-orientador:
Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar
(Programa de Pós-graduação em Cirurgia, Centro de Ciências da Saúde – UFPE).

RECIFE
2012

Catalogação na fonte
Bibliotecária Giseani Bezerra, CRB4-1738

G637p Gondim, Thiago Gomes de Figueiredo.
Proposta na utilização de biopolímero de cana-de açúcar como suporte na diferenciação “in vitro” de células-tronco mesenquimais humanas em queratinócitos / Thiago Gomes de Figueiredo Gondim. - Recife: O autor, 2012.
74 folhas: il. ; 30 cm.

Orientador: Paloma Lys de Medeiros.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2012.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Biopolímero. 3. Cana-de-açúcar. 4. Morfologia celular. 5. Diferenciação celular. 6. Queratinócitos. I.Medeiros, Paloma Lys de (Orientador). II. Título

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-116)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
Centro de Ciências da Saúde - UFPE
Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
http://www.pospat.ufpe.br

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TITULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

AUTOR: **THIAGO GOMES DE FIGUEIREDO GONDIM**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: **PATOLOGIA**

NOME DA DISSERTAÇÃO: "PROPOSTA NA UTILIZAÇÃO DE BIOPOLÍMERO DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUPORTE NA DIFERENCIAÇÃO *"IN VITRO"* DE CÉLULAS–TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS EM QUERATINÓCITOS*"*

ORIENTADORA: PROFA. DRA. PALOMA LYS DE MEDEIROS

DATA DA DEFESA: **28 DE FEVEREIRO DE 2012.**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. **Mário Ribeiro de Melo Júnior**

Prof. Dr. **Luiz Lúcio Soares da Silva**

Profa. Dra. **Eliete Cavalcanti da Silva**

Dedico tal esforço científico à minha Esposa Ana Katharina Jordão Aragão e à minha filhinha, recém-chegada há 4 meses, Helena Aragão Gondim, que em algumas madrugadas esteve comigo, dividindo a atenção do pesquisador com o pai. **Os afetos da minha vida**.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial à Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros, sempre na vanguarda do conhecimento. Disponível à pesquisa em todos os momentos. Interessada no engrandecimento de seu Departamento, Colegas e Alunos. Obrigado Profa. Paloma!

Ao Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar, que nos confiou oportunidade de trabalharmos com o gel biopolímero da cana de açúcar, um dos mais atuais e versáteis materiais colocados a serviço da pesquisa médica.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia-CCS/UFPE, o Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho, pelo incentivo científico e organização do Programa de Patologia.

Ao Chefe do Departamento de Histologia e Embriologia-CCB/UFPE, Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto, pela liberação de ambiente para a realização da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Hilton Justino da Silva, pelos ensinamentos teórico-práticos da introdução ao mestrado.

À Profa. Dra. Eliete Calvanti da Silva pela contribuição no desenvolvimento prático da pesquisa.

À Profa. Mestre Adriana Di Donato pelos ensinamentos na didática do ensino superior.

À Técnica Especializada e Graduada em Ciências Biológicas, Silvania Tavares Paz, pela brilhante apresentação do Laboratório do Programa de Patologia-CCS/UFPE e por seu entusiasmo em estudar e produzir cientificamente.

Aos alunos do Laboratório de Cultura de Tecidos, Luana Albuquerque Barros, Andriu dos Santos Catena e Maryana Roberta Pedrosa Dias, pelo apoio técnico necessário à produção das culturas celulares.

A todos os funcionários do Programa de Pós-Graduação em Patologia-CCS/UFPE, por todo o suporte ofertado ao desenvolvimento dos estudos.

Aos Órgãos de fomento, CAPES e PROPESQ/UFPE, pelo apoio financeiro concedido.

Muito Obrigado!

Thiago Gondim

RESUMO

As células-tronco mesenquimais constituem uma rara população de células progenitoras com capacidade de diferenciação multipotencial e parecem constituir uma ferramenta atrativa no contexto da engenharia de tecidos e da terapia celular. O desenvolvimento de novos materiais pode ser citado como um setor de vanguarda para a engenharia de tecidos; e os biopolímeros despontam como biomateriais inovadores com vasta aplicação na biologia celular, especialmente em função de sua biocompatibilidade. Nesse contexto, temos como principal objetivo estudar a evolução das características morfológicas das células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano quando cultivadas sobre suportes de biopolímero de cana-de-açúcar (gel ou membranas), enfatizando-se a potencial capacidade dessas células diferenciarem-se em queratinócitos. Cordões umbilicais foram obtidos de parturientes do Setor de Obstetrícia do Hospital das Clínicas/UFPE (n=40, com 30 a 40 semanas de idade gestacional). Veias de cordões umbilicais foram preenchidas com colagenase tipo IV e mantidas a 37º C. As células coletadas foram centrifugadas por 10 minutos e ressuspendidas em meio DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino, mistura de antibióticos e plaqueadas em garrafas (10^5 células/mL). Os aspectos morfológicos das células fenotipicamente semelhantes às células-tronco mesenquimais foram avaliados com 3, 5, 10, 14, 28, 40 e 45 dias, através de microscópio invertido com contraste de fase e sistema de captura de imagem. Com 72h de cultivo sobre um suporte comercial, observamos que as células-tronco mesenquimais apresentaram-se com aspecto fibroblastóide difuso e a formação de monocamada ocorreu com cinco dias. Células cultivadas em placas contendo o gel de biopolímero de cana-de-açúcar também apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos (72h), porém mais alongadas e dispostas radialmente; com formação de monocamada em torno de sete dias. Quando cultivadas sobre membranas desse biomaterial, notamos com o auxílio de microscópio invertido, células com formato variando de arredondadas a fibroblastóides, e através da microscopia eletrônica de varredura foi possível detalhar essa variação no formato das células e perceber a emissão de finos prolongamentos (nanofibras). Nos ensaios de diferenciação das células-tronco mesenquimais em queratinócitos usando-se o gel de biopolímero de cana-de-açúcar como suporte, observamos que inicialmente grande parte das células conservou a morfologia arredondada e apresentaram-se de forma enfileirada, especialmente em algumas áreas do referido gel, e em torno de 14 dias a típica forma cubóide-arredondada das colônias de queratinócitos pode ser observada. Os resultados do nosso estudo sugerem que os suportes (gel ou membranas) de biopolímeros de cana-de-açúcar foram capazes de favorecer o crescimento e a diferenciação das células-tronco mesenquimais e mais experimentos deverão ser realizados para que o cultivo dessas células nessas condições, possivelmente, possa fornecer uma fonte eticamente não controversa e facilmente acessível de queratinócitos para futuras aplicações experimentais e clínicas.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais; biopolímero de cana-de-açúcar; morfologia celular; diferenciação celular e queratinócitos.

ABSTRACT

The mesenchymal stem cells are a rare population of progenitor cells with multi-potential differentiation capacity and seem to be an attractive tool in the context of tissue engineering and cell therapy. The development of new materials can be cited as a leading sector for tissue engineering and biomaterials, biopolymers are considered innovative with wide application in cell biology, especially due to its biocompatibility. In this context, we have as main objective to study the evolution of morphological features of mesenchymal stem cells from human umbilical cord when grown on substrates sugarcanr biopolymer (gel or membranes), emphasizing the potential ability of these cells differentiate into keratinocytes. Umbilical cords were obtained from pregnant women of the Department of Obstetrics, Hospital das Clinicas / UFPE (n = 40, 30 to 40 weeks gestational age), Veins of umbilical cords were filled with collagenase type IV and maintained at 37 °C (5 min). The collected cells were centrifuged for 10 minutes and resuspended in DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum, misture of antibiotics, in bottles (10^5 cells/mL). The morphology of cells phenotypically similar to mesenchymal stem cells were evaluated 3, 5, 10, 14, 28, 40 and 45 days, using an inverted microscope with phase contrast and image capture system. With 72 h of cultivation using as commercial support, we found that mesenchymal stem cells presented with diffuse and fibroblastoid monolayer formation occurred in five days. Cells grown on the plates containing the gel of sugarcane biopolymer also showed morphology similar to fibroblasts (72 h), but more elongated and arranged radially, whereas the formation of fibroblastoid colonies was visualized with seven days. When cultured on membranes we noted by inverted microscope cells with rounded format ranging from and fibroblastoid; and by the electron microscopy was possible to detail the variation in cell shape and realize the issue of thin extensions (nanofibers). In assays of differentiation of mesenchymal stem cells into keratinocytes using gel of sugarcane biopolymer as a support largely observed that initially retained the morphology of the cells were rounded and is lined form, especially in some areas of the gel and around 14 days the typical cuboidal shape-rounded colonies of keratinocytes can be observed. The results of our study suggest that the supports (gel or membrane) of sugarcane biopolymers were able to enhance growth and differentiation of mesenchymal stem cells and more experiments should be made so that the cultivation of these cells under these conditions possibly can provide a source ethically uncontroversial and easily accessible from keratinocytes for future experimental and clinical applications.

Keywords: Mesenchymal stem cells; biopolymer cane sugar, cell morphology, cell differentiation and keratinocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fotomicrografias da evolução do cultivo de células-tronco de cordão umbilical humano realizadas com microscópio óptico invertido: A) Células com aspecto fibroblastóide e algumas de forma arredondada são observadas com 72 horas de cultivo. B) Formação de monocamada após cinco dias e C) Área ampliada da monocamada. D) células confluentes com dez dias. E) Subcultura (1ª passagem): notar grande densidade de células com morfologia alongada, totalizando-se 14 dias a partir do cultivo inicial e F) Área ampliada do cultivo de 14 dias, com células alongadas e evidente processo de divisão celular. Escala de barra = 200 µm (A, B, D e E), 100 µm (C), 50 µm (F).	**44**
Figura 2	Cultura de células fenotipicamente semelhantes às células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano após 28 dias. A) células com evidente expansão citoplasmática ao redor do núcleo. B, C e D) Células com prolongamentos citoplasmáticos em forma de leque, núcleos ovais e mais de um nucléolo. Escala de barra = 100 µm.	**45**
Figura 3	Cultura de células fenotipicamente semelhantes às células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano após 40 dias. Células com prolongamentos citoplasmáticos ramificados e remodelação citoplasmática permitindo um aumento de comunicação celular. Escala de barra = 200 µm (A), 100 µm (B e C).	**45**
Figura 4	Cultura de células-tronco de cordão umbilical humano após 45 dias. Células com regiões citoplasmáticas rendilhadas. Escala de barra = 100 µm.	**45**
Figura 5	Fotomicrografias da evolução do cultivo de CTMs cultivadas sobre o gel de biopolímero de cana-de-açúcar avaliado através de microscópio óptico invertido: A) Células fibroblastóides dispostas em arranjo radial, observáveis com 72 horas de cultivo (100x). B) Ampliação de parte das células em arranjo radial, destacando a morfologia alongada das mesmas (200x). C) Colônias fibroblastóides com sete dias de cultivo (100x).	**47**
Figura 6	Fotomicrografia da evolução do cultivo (em torno de cinco dias) de CTMs de cordão umbilical humano sobre membrana de biopolímero de cana-de-açúcar: A) Células com formato variando de arredondadas (maior parte) a fibroblastóides (100x).	**47**
Figura 7	Fotomicrografia da evolução do cultivo (com 07 dias) de CTMs de cordão umbilical humano sobre membrana de biopolímero de cana-de-açúcar: A) Células em processo de confluência sobre o novo suporte (100x).	**48**
Figura 8	Microscopia eletrônica de varredura de células-tronco mesenquimais (CTMs) sob a membrana de biopolímero de cana-de-açúcar. É possível observar a morfologia arredondada das células e algumas com aspecto irregular (A e B).	**48**
Figura 9	Micrografia de microscopia eletrônica de varredura de célula-tronco mesenquimal (CTM) cultivada em membrana de biopolímero de cana-de-açúcar. A) Finas conexões celulares (nanofibras) são observadas em direção à malha do biopolímero de cana-de-açúcar e também interconexões entre as células.	**49**
Figura10	Micrografias de microscopia eletrônica de varredura detalhando a superfície da membrana do biopolímero de cana-de-açúcar. A) Nota-se o aspecto entrelaçado das finas conexões celulares (nanofibras) e B) Representação exclusiva da malha do biopolímero de cana-de-açúcar com longas fibras entrelaçadas e dispostas homogeneamente.	**49**
Figura11	Cultura de CTMs com uma semana sob a influência de diferenciador para células epiteliais (queratinócitos) no gel de biopolímero de cana-de-açúcar, avaliadas através de microscópio invertido por contraste de fase. A) Gel de biopolímero de cana-de-açúcar (em grumos) sem células. B) CTMs semeadas sobre o biomaterial; C) Nota-se a disposição das células em fileira na borda de alguns grumos do referido gel (200x). D) Ampliação (200x) de um conjunto de células enfileiradas e alguns conglomerados no interior do gel de cana-de-açúcar. A e B (100x).	**50**
Figura12	Cultura de CTMs com duas semanas sob a influência de diferenciador para células epiteliais (queratinócitos) no gel de biopolímero de cana-de-açúcar, avaliadas através de microscópio invertido por contraste de fase. A) Gel de biopolímero de cana-de-açúcar (em grumos) com células sob ação do diferenciador. B) CTMs semeadas sobre o biomaterial; C) Nota-se a disposição das células em fileira na borda do referido gel (200x). D) Ampliação (200x) de um conjunto de células cubóide-arredondadas no gel de biopolímero de cana-de-açúcar. A e B (100x).	**51**

SUMÁRIO ***Pgs.***

RESUMO
ABSTRACT
LISTA DE ILUSTRAÇÕES
1. INTRODUÇÃO 10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 13
2.2. Células-tronco mesenquimais 13
2.2.1 Breve histórico 13
2.2.2 Fontes de células-tronco mesenquimais 13
2.2.3 Imunofenotipagem 14
2.3. Células-tronco mesenquimais e a engenharia tecidual 15
2.4. Biomateriais 16
2.5. Diferenciação de células-tronco em queratinócitos *in vitro* 17
3. OBJETIVOS 20
3.1. Geral 20
3.2. Específicos 20
4. ARTIGO DE REVISÃO 21
5. MATERIAL E MÉTODO 41
5.1. Biomateriais 41
5.2. Cultura de células-tronco 41
5.2.1 Casuística e manuseio dos cordões umbilicais 41
5.2.2 Isolamento e cultura das células-tronco mesenquimais 41
5.2.3 Avaliação da densidade e sobrevivência das células 42
5.3. Imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais 42
5.4. Avaliação das características morfológicas das células-tronco mesenquimais 42
5.5. Diferenciação celular em queratinócitos 43
6. RESULTADOS 44
6.1. Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais sobre a gelatina Porcina® 44
6.2. Análise da imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais 46
6.3. Cultivo das células-tronco mesenquimais sobre o gel de biopolímero de cana-de-açúcar 46

6.4. Cultivo das células-tronco mesenquimais sobre membranas de biopolímero de cana-de-açúcar 47
6.5. Cultivo das células-tronco mesenquimais na ausência de diferenciadores em membranas de biopolímero de cana-de-açúcar avaliadas através da microscopia eletrônica de varredura 48
6.6. Culturas de células-tronco mesenquimais sob ação de diferenciador para células epiteliais (queratinócitos) no gel de biopolímero de cana-de-açúcar avaliadas através da microscopia invertida por contraste de fase 49
7. DISCUSSÃO 52
8. CONCLUSÕES 55
9. PERSPECTIVA 56
10. REFERÊNCIAS 57
11. ANEXOS
11.1. Anexo A (parecer do Comitê de Ética em Pesquisa) 67
11.2. Anexo B (submissão do artigo à Revista Anais Brasileiros de Dermatologia) 69
11.3. Anexo C (artigo a ser submetido à Revista Biological Research - SSN 0716-9760, Qualis B1.) 71
11.4. Anexo D – Resumo publicado em Anais do I Luso-Brazilian Gongress of the Experimental Patology – XI International Syposium Experimental Techniques (Recife-Brazil 2011) 74

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população mundial está associado ao crescimento de doenças crônico-degenerativas. Essas doenças representam um alto custo social, além de muitas não terem um tratamento efetivo. Neste contexto, as células-tronco (CTs) surgem como objeto de interesse por suas propriedades biológicas e potencial médico terapêutico (WEISSMAN, 1997; DEVINE, 2002).

As CTs são células indiferenciadas que possuem a capacidade de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens (ERICES; CONGEST; MINGUELL, 2000; QUESENBERRY *et al.*, 2004; LAKSSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005). As CTs adultas multipotentes são as principais células utilizadas nas pesquisas que exploram a questão do potencial terapêutico das mesmas. Todavia, estudos e aplicações clínicas com células embrionárias têm se mostrado desafiadores em razão de várias controvérsias éticas e políticas em torno de sua utilização, além de seu alto potencial carcinogênico (REUBINOFF; PERA; FONG, 2000; CIVIN, 2002). Desta forma, as CTs obtidas de tecidos adultos vêm sendo amplamente estudadas (RABIE *et al*., 2007).

Dentre as CTs adultas, as células-tronco mesenquimais (CTMs) se destacam pela diferenciação em diversos tipos celulares *in vitro* e *in vivo*, por terem um isolamento relativamente fácil com alto poder de expansão e suas características imunológicas, como imunorregulação e baixa imunogenicidade, as tornam uma ferramenta promissora para a terapia gênica, celular e engenharia tecidual (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

As células-tronco têm a capacidade de se renovarem e se diferenciarem em várias linhagens de tecidos (FRIEDENSTEIN; DERIGLAZONVA; KULAGINA, 1974; PITTENGER *et al.*, 1999; DEANS *et al.*, 2000; MINGUELL *et al.*, 2000; ORLIC *et al.*, 2001; KOC; LAZARUS, 2001; ROMANOV *et al.*, 2003; GROVE *et al.*, 2004; KIM *et. al.*, 2004; ZATZ, 2005; JANG *et al.*, 2006; CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; SASAHARA *et al.*, 2009; TOAI *et al.*, 2009; TOAI *et al.*, 2010). Isto assegura um enorme potencial para terapias médicas; uma vez que, essas células podem ser utilizadas para reparar danos provenientes de acidentes e doenças (VILAS-BOAS *et al.*, 2004; MEIRELE, 2006; 2008).

As pesquisas com células-tronco estão ainda num estágio muito inicial e muitas questões científicas devem ser resolvidas até suas aplicações se tornarem definitivas. Desenvolver novas

técnicas e aprimorar as já desenvolvidas continua sendo importante enfoque de estudo na utilização de células-tronco, bem como polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos (ALPETER *et al.*, 2004; HERNIGOU *et al.*, 2005, HENG; LIU; PHAN, 2005).

A engenharia tecidual é uma ciência que visa superar as limitações advindas pelo uso de próteses artificiais através da substituição por tecidos autólogos cultivados *in vitro* que tenham a capacidade de crescimento, remodelação e regeneração *in vivo* (SCHMIDT *et al.*, 2006). A primeira etapa para a criação e estabelecimento de um substituto biológico é iniciada com o desenvolvimento, seleção e processamento de novos suportes (BARBANTI; SAVAGLIA, 2005).

Vários fatores empregados na engenharia tecidual, a exemplo dos biomateriais, são necessários para a proliferação e diferenciação celular, especialmente com relação ao aspecto de biocompatibilidade associada à superfície desses novos materiais (LOBO, 2008; PLACE; EVANS; STEVENS, 2009).

Os biomateriais proporcionam um suporte *in vivo* para manter a integridade das células contra forças mecânicas teciduais, enquanto sustentam o crescimento celular, até a formação de uma nova matriz extracelular. Uma vez que, a maioria das células de mamíferos é do tipo aderente, ou seja, elas morreriam se não aderissem a um substrato específico. Assim, os biomateriais proporcionam a adesão celular e podem servir para a distribuição dessas células com maior eficiência no sítio de injúria (KIM *et al.*, 2007).

Os biopolímeros são considerados biomateriais de origem natural com aplicações na economia, desde a produção de alimentos à implantação de novas plataformas para diferenciação celular e decorrente neoformação de tecidos com ampla aplicabilidade na área médica. Eles podem ser divididos em poliésteres, poliamida e polissacarídeos; logo quando utilizados na engenharia tecidual tem a vantagem de evitar possíveis processos de rejeição (XUE; GREISLER, 2003). Por sua vez, compreender os mecanismos básicos do cultivo das células-tronco mesenquimais *in vitro* é um fator chave para o desenvolvimento de novas terapias.

Para que um biomaterial possa ser aplicado na engenharia tecidual, diversas propriedades deverão ser avaliadas. A primeira delas refere-se à biocompatibilidade do material e após isso, estudos devem ser realizados para verificar a adesão e proliferação celular em cultura (ERICES *et al.*, 2000; COVAS *et al.*, 2003; MADLA *et al.*, 2005).

O biopolímero a ser trabalhado é um exopolissacarideo produzido a partir da fermentação do melaço (de cana-de-açúcar) pela bactéria *Zoogloea sp*., e desde 2001 foi desenvolvido, no

Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE, uma série de ensaios químicos para adequar o biopolímero às diversas aplicações cirúrgicas (PETERSON-BEEDLE *et al*., 2000; AGUIAR *et al*., 2007; CAVALCANTE, *et al*., 2007; SILVEIRA *et al*., 2007).

Uma das características dos biopolímeros que contêm carboidratos consiste em sua relevante biocompatibilidade, o que viabiliza suas aplicações farmacológica, biotecnológica e biomédica. Estes polissacarídeos são utilizados na fabricação de cápsulas biodegradáveis, hidrogéis biocompativeis e bioimplantes (SANTOS-MAGALHÃES *et al*., 2007), em material para sutura, além de malhas disponíveis para substituição de tecidos isentas de reações alérgicas por contato (VAN DE VELDE; KIENKENS, 2002; VARMA *et al*., 2004; LIMA, *et al*. 2005; SILVA *et al*., 2006; CZAJA *et al*., 2006; CHAGAS *et al*., 2006).

Estudos prévios demonstraram a baixa citotoxicidade desse material, constituindo-se em um dos primeiros ensaios para a potencial aplicação clínica de um novo material (CASTRO *et al*., 2004). Pesquisas envolvendo o uso de membranas de biopolímero de cana-de-açúcar na reconstrução de artérias comprovaram a eficácia dessas no campo da angioplastia (MARQUES *et al*., 2007). E segundo, Medeiros *et al*. (2008) e Barros (2010) o uso do biopolímero de cana-de-açúcar como um novo suporte de cultivo das CTMs de cordão umbilical humano foi capaz de sustentar o crescimento das mesmas, favorecendo a remodelação citoplasmática com o evoluir da cultura.

Recentemente, a idéia de se obter queratinócitos a partir de CTMs de cordão umbilical humano vem se tornando o alvo da investigação de alguns pesquisadores; devido principalmente à capacidade de diferenciação dessas células e habilidades imunomodulatórias e antiinflamatórias, naturezas cruciais nos casos de procedimentos de enxerto para regeneração da pele (LEE *et al*., 2004; TSE; LAUGHLIN, 2005; KOGLER; WERNET, 2006; VAN de VEM *et al*., 2007; TOAI *et al*., 2009).

Em vista do exposto, no presente estudo, objetivou-se avaliar a utilização de biopolímeros de cana-de-açúcar (gel e membranas) como suportes no cultivo de queratinócitos a partir da diferenciação de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.2. Células-Tronco Mesenquimais

2.2.1 *Breve Histórico*

A existência de células-tronco não-hematopoiéticas na medula óssea foi inicialmente sugerida por Clonheim, em 1867. No entanto, só com os achados de Friedenstein *et al*. (1974) é que essa teoria veio a ser comprovada. Em meados da década de 70 na Rússia, Friedenstein foi considerado o primeiro pesquisador a descrever o isolamento na medula óssea de uma população de células clonogênicas aderentes ao plástico, em formato de espículas, dispostas em monocamada, que definiu como *Unidades de Colônias formadoras de Fibroblastos* (CFU-Fs).

Posteriormente, Owen demonstrou que essas células eram precursores comuns dos tecidos mesenquimais, ou seja, dotadas da capacidade de se transformarem em condrócitos, osteócitos e adipócitos. Com base nesses estudos que comprovaram a capacidade de autorrenovação e diferenciação, as células estromais de medula óssea foram consideradas células-tronco por Caplan e passaram a ser denominadas de células-tronco mesenquimais.

2.2.2 *Fontes de Células-Tronco Mesenquimais*

A medula óssea constitui um dos principais sítios doadores de CTMs, assim como de células-tronco hematopoiéticas (CTH) e endoteliais (PINTTENGER *et al*., 1999). Entretanto, as CTMs estão presentes virtualmente em todos os órgãos do corpo; fornecendo suporte estrutural, além de regular a passagem de células através dos tecidos (BYDLOWSKI *et al*., 2009).

Recentemente, CTs da medula óssea de camundongos foram injetadas endovenosamente em um modelo murino de cardiopatia chagásica crônica, tendo sido observado uma melhora da miocardite e diminuição da fibrose do tecido afetado (SOARES *et al*., 2007). Em outro estudo com seres humanos, células da medula óssea da crista ilíaca de pacientes com cardiopatia chagásica foram extraídas, purificadas e reintroduzidas nesses pacientes através de cateterismo coronariano, onde os resultados preliminares deste procedimento demonstraram ser esta uma terapia segura e exeqüível (VILAS-BOAS *et al*., 2004).

O sangue de cordão umbilical (SCU) é uma rica fonte de células progenitoras e CTs hematopoiéticas comumente utilizadas para aplicações clínicas. Dados referentes à presença de

CTMs no SCU são controversos. Segundo Mareschi *et al*. (2001) essas células não poderiam ser cultivadas isoladamente ou sucessivamente a partir do SCU de um doador a termo. Em um estudo recente, Secco *et al*. (2008) compararam a eficiência em obter CTMs do cordão umbilical e do SCU e sugeriram que o cordão é a fonte mais fácil de se obter CTMs e o seu armazenamento em bancos públicos e privados de cordão. Por outro lado, Erices *et al*. (2000) e Campagnoli *et al*. (2001) defenderam a presença de CTMs em diversos órgãos fetais e circulando no sangue de fetos pré-termos simultaneamente com precursores hematopoiéticos. Esses achados conduzem a questão de que as CTMs possivelmente estão depositadas no estroma placentário e/ou no estroma do cordão umbilical, incluindo-se também aquele pertencente à parede dos vasos sangüíneos, em especial a veia do cordão umbilical.

Covas *et al*. (2003) e Romanov *et al*. (2003) estabeleceram culturas de CTMs provenientes das camadas endotelial e subendotelial de veias do cordão umbilical humano e observaram que essas células apresentavam morfologia semelhante a fibroblastos com capacidade de se diferenciarem em adipócitos e osteoblastos, cuja expressão mesenquimal foi revelada com o auxílio de marcadores comerciais.

2.2.3 *Imunofenotipagem*

Todas as células do organismo apresentam um perfil de marcadores de superfície que caracterizam a singularidade biológica e a marca das células que os contêm (COVAS, 2006). Apesar da grande quantidade de marcadores positivos descritos na literatura não há para as CTMs um marcador positivo definido e definitivo. Sendo sua caracterização estabelecida pela identificação de uma combinação de marcadores específicos e não específicos.

Para a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) as CTMs são positivas para a expressão dos marcadores CD105, CD73 e CD90 e; os marcadores CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR não devem ser expressos em mais de 95% das células em cultura. Esta mesma sociedade estabelece também que: quando ausentes as expressões dos marcadores hematopoiéticos a identificação das CTM pode ser feita apenas pela detecção da expressão dos marcadores CD105, CD73 e CD90. Porém, as células devem ser aderentes, cultiváveis por longos períodos e capazes de se diferenciar em pelo menos duas linhagens celulares (HORWITZ *et al*., 2005).

Essas células também expressam os marcadores de indiferenciação OCT-4, Nanog e SSAE ¾ (BAKSH *et al*., 2004).

Existe um consenso na literatura de que as CTMs não possuem marcadores típicos de células de linhagens hematopoiéticas e endoteliais, como, por exemplo: CD11b (marcador de célula imune - integrina Mac-1), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo LPS), CD31 (PECAM-1: molécula de adesão plaquetária), CD33 (receptor transmembrana de células mieloides), CD34 (receptor de células endoteliais), CD133 e CD45 (presentes em todas as células hematopoiéticas). A ausência dos antígenos CD14, CD34 e CD45 na superfície dessas células mesenquimais permite distingui-las das precursoras hematopoéticas (LIU *et al*., 2009).

2.3. Células-Tronco Mesenquimais e a Engenharia de Tecidos

As pesquisas com células-tronco estão ainda num estágio muito inicial e muitas questões científicas devem ser resolvidas até suas aplicações se tornarem definitivas. Desenvolver novas técnicas e aprimorar as já desenvolvidas continua sendo importante enfoque de estudo na utilização de polímeros biorreabsorvíveis na engenharia de tecidos (ALPETER *et al*., 2004).

A engenharia tecidual é uma ciência que visa superar as limitações advindas pelo uso de próteses artificiais através da substituição por tecidos autólogos cultivados *in vitro* que tenham a capacidade de crescimento, remodelação e regeneração *in vivo* (SCHMIDT *et al*., 2006). A primeira etapa para a criação e estabelecimento de um substituto biológico é iniciada com o desenvolvimento, seleção e processamento de novos suportes (BARBANTI; SAVAGLIA, 2005).

Vários fatores empregados na engenharia tecidual, a exemplo dos biomateriais, são necessários para a proliferação e diferenciação celular, especialmente com relação ao aspecto de biocompatibilidade associada à superfície desses novos materiais (LOBO, 2008; PLACE; EVANS; STEVENS, 2009).

Os biomateriais proporcionam um suporte *in vivo* para manter a integridade das células contra forças mecânicas teciduais, enquanto sustentam o crescimento celular, até a formação de uma nova matriz extracelular. A injeção direta de suspensão celular numa região comprometida, sem uma matriz de biomaterial, dificultaria a localização das células transplantadas no local da injúria; considerando-se também que a maioria das células de mamíferos é do tipo aderente, ou seja, elas morreriam se não aderissem a um substrato específico. Assim, os biomateriais

proporcionam a adesão celular e podem servir para a distribuição dessas células com maior eficiência no sítio de injúria (KIM *et al*., 2007).

Os biopolímeros são um tipo de biomaterial de origem natural que têm aplicação em diversos setores econômicos, desde a produção de alimentos à implantação de novas plataformas para diferenciação celular e decorrente neoformação de tecidos com ampla aplicabilidade na área médica. Podem ser divididos em poliésteres, poliamida e polissacarídeos. A utilização desses polímeros pela engenharia tecidual tem a vantagem de evitar possíveis processos de rejeição (XUE; GREISLER, 2003). Por sua vez, compreender os mecanismos básicos do cultivo dessas células-tronco mesenquimais *in vitro* é um fator chave para o desenvolvimento de novas terapias.

O desenvolvimento de um biomaterial para ser aplicado na engenharia tecidual exige que diversas propriedades sejam avaliadas. A primeira delas refere-se à biocompatibilidade do material e após isso, estudos devem ser realizados para verificar a adesão e proliferação celular em cultura (ERICES *et al*., 2000; COVAS *et al*., 2003; MADLA *et al*., 2005).

Os biomateriais empregados podem ser classificados como permanentes ou temporários; ou seja, materiais permanentes são compostos utilizados com o objetivo de substituir um tecido lesado por tempo indeterminado e dessa forma, são produzidos de modo a reter as suas características mecânicas e físico-químicas por longos períodos. Esses tipos de dispositivos são comumente empregados como próteses substituindo articulações danificadas, válvulas cardíacas, lentes intra-oculares e outras utilizações. Por outro lado, existem situações em que são necessários suportes que preencham apenas temporariamente regiões lesadas, até que a recomposição tecidual se concretize, ou ainda que direcione o processo regenerativo. Nesse caso, uma alternativa são os biomateriais temporários (KAPLAN, 1998; DONATH *et al*., 2000).

2.4. Biomateriais

Biomaterial é todo material que entra em contato com fluídos corporais, de modo contínuo ou intermitente, mesmo que esteja localizado fora do corpo (PARK, 1979). Todo biomaterial deve apresentar características como não-toxicidade, não serem carcinogênicos, alergênicos ou mutagênicos e não devem causar danos locais ou sistêmicos (DONATH *et al*., 2000).

O biomaterial pode ser de origem animal ou sintético, tendo natureza metálica, cerâmica ou polimérica, utilizado nas substituições com características as mais próximas das ideais. Sintéticos

ou naturais, todos os biomateriais têm que exibir a capacidade de serem bem tolerados pelo organismo do hospedeiro (LYAM, 1989).

Dentre o biomateriais, uma grande importância tem sido dada aos biopolímeros, que de acordo com a Associação Nacional de Biossegurança são considerados materiais poliméricos classificados estruturalmente como polissacarídeos, poliésteres ou poliamidas. A matéria-prima principal para a sua manufatura é uma fonte de carbono renovável, geralmente um carboidrato derivado da cana-de-açúcar, milho, batata, trigo ou beterraba (ANBIO – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE BIOSEGURANÇA, 2002).

Esse biomaterial tem um elevado potencial em diversas aplicações biomédicas devido à versatilidade química. Tendo as suas propriedades facilmente alteradas por métodos físicos e químicos, permitindo a seleção de propriedades importantes para cada aplicação (KAPLAN, 1998).

A partir da década de 1960, o uso de polímeros biodegradáveis como implantes temporários ganharam uma importância crescente na área médica, abrangendo um vasto número de aplicações, tais como sua utilização em suturas cirúrgicas, sistemas para liberação controlada de drogas e dispositivos ortopédicos. Dessa maneira, os polímeros biodegradáveis vêm se destacando, cada vez mais, na engenharia de tecidos (BARBANTI *et al*., 2002).

O polissacarídeo extracelular (biopolímero de cana-de-açúcar) conseguiu diminuir o tempo de cicatrização em feridas cutâneas de animais domésticos (COELHO *et al*., 2002). Foi comprovado que o referido biopolímero apresenta resultados semelhantes à fascia autóloga quando de enxerto livre no tratamento de perfurações crônicas da membrana timpânica de *Chinchilla laniger* (SILVA *et al*., 2006). Os implantes formulados a partir de membrana do polissacarídeo, utilizados para reparo de defeitos produzidos na parede abdominal em ratos, quando comparada ao politetrafluoretileno expandido, mostrou maior resistência à tração na interface implante/hospedeiro (FALCÃO; COELHO; NETO, 2008). A membrana do biopolímero de cana-de-açúcar ainda mostrou resposta inflamatória comparável ao polipropileno, quando da aplicação de telas ao peritônio parietal de ratos, avaliada através da formação de aderências com epíplon e alças intestinais (LIMA *et al*, 2005).

2.5. Diferenciação de Células-tronco em Queratinócitos *in vitro*

Encontrar o caminho da regeneração perfeita após lesões corporais é sonho de médicos e cientistas (FU; LI, 2008). A resposta biológica a ferimentos em organismos superiores é dividida, de forma primária, em duas categorias: regeneração tecidual e reparação de ferida (CLARK *et al*.,1998). Alguns órgãos, como a pele, coração, pulmão e fígado não conseguem a regeneração completa (STOCUM, 2004). Nos últimos anos tem havido grande sucesso em se alcançar a aceleração da capacidade de cicatrização de feridas (FU *et al*., 2000). Alguns trabalhos têm mostrado uma diminuição no tempo de cicatrização através do tratamento com fator básico de crescimento de fibroblasto recobinante (bFGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), que encurtam em 2 a 4 dias o tempo de tratamento quando comparado a terapêuticas tradicionais (YOSHIKAWA *et al*., 2008), mostrando que alguns mediadores podem diminuir o tempo de cicatrização da pele.

Autores têm optado por aplicar células-tronco derivadas da medula óssea com o objetivo de reconstruir a pele em feridas crônicas não cicatrizadas. Trabalhos vêm provando que a regeneração cutânea é possível com o uso de células-tronco, provendo a redução da cicatriz, restabelecendo a anatomia e fisiologia normais da pele. Essas pesquisas apontam para as células-tronco adultas que podem ser utilizadas na regeneração de tecidos e órgãos em quase todas as lesões. O uso de células-tronco adultas nas pesquisas médicas, especialmente as mesenquimais (CTMs), tem sido requerido por mostrar bons resultados e afastar-se de diversos dos problemas relacionados às células-tronco embrionárias (FU e LI, 2008).

Os estudos atuais mostram que as CTMs têm a capacidade de diferenciação para locais específicos em resposta às condições fornecidas por diferentes microambientes (FU *et al*., 2006a). CTMs ainda expressaram a proteína queratina "*keratinocytespecific*" e formam estruturas glandulares, tendo mostrado nas feridas, acelerada resolução e altos níveis de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e angiopoietina-1, sugerindo-se que as CTMs são capazes de promover cicatrização através de uma contribuição direta e liberação de fatores pro-angiogênicos (WU *et al*., 2008).

Com o objetivo de diferenciar células-tronco obtidas do interior de blastocistos de ratos, estudos foram realizados utilizando-se parte do meio de cultura com MEF (fator epidermal liberado por células alimentadoras) (JANG *et al*, 2008).

Ainda em 2009 pode ser citado o uso de $CaCl_2$ (1,2 mM) para a diferenciação dos queratinócitos (SASAHARA, 2009).

Células-tronco foram diferenciadas em queratinócitos a partir do uso de mitomycina-C tratada e a presença de fibroblastos 3T3 em meio FAD (3:1, mistura de *Dulbecco's modified Eagle's medium* [DMEM] e meio Ham-F12), suplementado em 10% de soro fetal bovino suplementado com insulina, hidrocortisona, toxina colérica, triiodotironina, adenina e fator de crescimento epidérmico (recombinante humano). Diferenciação ectodérmica também pode ser referida quando induzida por proteína morfogenética humana recombinante tipo IV e ácido ascórbico (GUENOU, 2009).

Fortunel *et al*. (2010) realizaram procedimento para a diferenciação de células-tronco epidérmicas em queratinócitos utilizando uma mistura de meios com DMEM e Ham-F12 (3:1), mais soro fetal bovino, fator de crescimento epidermal (EGF), transferrina, insulina, hidrocortisona, adenina, triiodothironina, L-glutamina, e mistura de antibióticos; essas culturas foram acondicionadas em placas com colágeno tipo I, fibroblastos e CO_2 a 5%. A associação de ácido ascórbico e proteína morfogenética tipo IV, também pode ser citada no processo de diferenciação de CTMs em queratinócitos (DEL CARLO, 2007; NISSAN, 2010).

Recentes estudos apostam na fabricação de substitutos dermais contendo CTMs, aumentando-se a complexidade de determinados suportes (3D), o que envolve novas tecnologias (HODGKINSON; BAYAT, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Estudar a evolução das características morfológicas das células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano cultivadas sobre suportes de biopolímero de cana-de-açúcar (gel e membranas), observando a possível capacidade de se diferenciarem em queratinócitos.

3.2. Específicos

- Isolar e cultivar as células-tronco mesenquimais obtidas da veia de cordão umbilical humano, observar semanalmente através de sistema de vídeo-microscopia.
- Realizar a imunofenotipagem das células através da utilização de marcadores específicos.
- Acompanhar a evolução das culturas e subculturas de CTMs através de sistema de vídeo imagem.
- Averiguar a compatibilidade dessas células com os novos suportes através da microscopia eletrônica de varredura (ME).
- Analisar as características morfológicas das células-tronco mesenquimais durante o processo de diferenciação em queratinócitos, quando cultivadas sobre o gel de biopolímero de cana-de-açúcar.

4. ARTIGO DE REVISÃO

Submetido aos Anais Brasile7iros de Dermatologia (ISSN 0365-0596) em 22/02/2012 (QUALIS B3).

Título do artigo:

DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM QUERATINÓCITOS *IN VITRO*

Autores:

GONDIM, T.G.F.[1,2*]; BARROS, L.A.[2,3]; CATENA, A.S.[2]; DIAS, M.R.P.[2]; SILVA, E.C.[2]; AGUIAR, J. L. A.[4]; MEDEIROS, P.L. [1,2]

[1]*Postgraduate Program in Pathology* of *Health Sciences Center, University Federal of Pernambuco. Recife-PE, Brazil.*

[2]*Department of Histology and Embryology of Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco. Recife-PE, Brazil.*

[3]*Postgraduate Program in Innovation Therapeutics* of *University Federal of Pernambuco. Recife-PE, Brazil.*

[4]*Postgraduate Program in Surgery of Department of Surgery, Clinical Hospital - University Federal of Pernambuco. Recife-PE, Brazil.*

***Corresponding author**: Thiago Gomes de Figueiredo Gondim, Programa de Pós-graduação em Patologia-CCS/UFPE (mestrando). Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Cidade Universitária, S/N. Recife-Pernambuco, Brazil. CEP: 50.670-901. Phone (international): +55.81.2126-8529. Fax (international): +55.81.2126-8529. e-mail: thiago.gfgondim@ufpe.br

BARROS, L.A. – Luana Albuquerque Barros (Pós-graduanda do Programa de Inovação Terapêutica – UFPE); email: luana_abarros@yahoo.com.br

CATENA, A.S – Andriu dos Santos Catena (Graduando do Curso de Biomedicina e Bolsista do Programa de Iniciação Científica pela UFPE–PIBIC/2011); email: andriucatena@gmail.com

DIAS, M.R.P. – Maryana Roberta Pedrosa Dias (Graduanda do Curso Licenciatura em Ciências Biológicas e Voluntária do Programa de Iniciação Científica pela UFPE-PIBIC/2011); email: marydias.pe@ hotmail.com

SILVA, E.C. - Prof[a]. Dra. Eliete Cavalcanti da Silva (Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia-CCB/UFPE); elicavalcanti@gmail.com

AGUIAR, J. L. A- Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar (Departamento de Cirurgia do Hospital das Clínicas – CCS/UFPE); email: Aguiar@terra.com.br

MEDEIROS, P.L. - Prof[a]. Dra. Paloma Lys de Medeiros (Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia-CCB/UFPE); pmedlys@gmail.com

RESUMO

Revisão sistemática sobre a metodologia impressa a culturas de células-tronco (embrionárias e adultas) com o objetivo de diferenciação celular em quearatinócitos. Nosso trabalho relaciona os artigos que informam sobre estimulações vigentes em diferenciação celular de células-tronco *in vitro*. Pesquisa realizada nos bancos de dados PUBMED e BVS, utilizando os seguintes descritores associados (DECS/MESH TERMS): STEM CELLS, CELL DIFFERENTIATION, KERATINOCYTES e CELL CULTURE TECHNIQUES e uma segunda pesquisa onde se retirou o último descritor. Foram observados 13 (treze) artigos que versavam sobre o tema, incluindo metodologia de diferenciação de células-tronco em cultura. A avaliação dos artigos demonstrou a falta de seguimento de um protocolo unificado, que pudesse trazer um nível de segurança comprovado nas diferenciações das células tronco em linhagem epidérmica.
Palavras-Chaves: Células-Tronco, Queratinócitos, Diferenciação Celular, Cultura de Células (técnicas).

ABSTRACT

Systematic review of the methodology printed in cultures of stem cells (embryonic and adult) with the objective of cellular differentiation in keratinocytes. Our work relates the articles that report on current stimulation in cell differentiation of stem cells *in vitro*. Study was performed in the databases PubMed and BVS, using the following descriptors associated (DECS / MESH TERMS): STEM CELLS, CELL DIFFERENTIATION, KERATINOCYTES and CELL CULTURE TECHNIQUES and a second survey which withdrew the last descriptor. There were 14 (fourteen) articles that focused on the subject, including methods of differentiation of stem cells in culture. The assessment demonstrated the lack of articles following a unified protocol, which could bring a security level established in the differentiation of stem cells in epidermal line.
Keywords: STEM CELLS, KERATINOCYTES, CELLS DIFFERENTIATION, CELL CULTURE TECHNIQUES.

DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM QUERATINÓCITOS *IN VITRO*

INTRODUÇÃO

Encontrar o caminho da regeneração perfeita após lesões corporais é sonho de médicos e cientistas[1]. Injúrias químicas e físicas à pele têm sido uma crescente, principalmente quando relacionamos tais acontecimentos à evolução da indústria em todo o mundo[2,3]. A resposta biológica a ferimentos em organismos superiores é dividida, de forma primária, em duas categorias: regeneração tecidual e reparação de ferida[4]. Alguns órgãos, como a pele, coração, pulmão e fígado não conseguem a regeneração completa[5]. Nos últimos anos tem havido grande sucesso em se alcançar a aceleração da capacidade de cicatrização de feridas. Alguns trabalhos têm mostrado uma diminuição do tempo de cicatrização através do tratamento com fator básico de crescimento de fibroblasto recombinante (bFGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), que encurtam em 2 a 4 dias o tempo de tratamento quando comparado a terapêuticas tradicionais[6], mostrando que alguns mediadores podem diminuir o tempo de cicatrização da pele. Grandes avanços têm sido encontrados na pesquisa em medicina regenerativa com a utilização de células-tronco embrionárias e adultas, em enxertos e engenharia tecidual. As células-tronco são capazes de se autorrenovação, tornando-se assim uma fonte ilimitada de material para enxertos e transplantes, contudo há a necessidade do desenvolvimento de protocolos bem definidos e eficientes para o direcionamento das diferenciações em linhagens específicas, objetivo conseguido com tais células, como a linhagem epidérmica queratinocítica[7].

Autores têm optado por aplicar células-tronco derivadas da medula óssea com o objetivo de reconstruir a pele em feridas crônicas não cicatrizadas. Trabalhos vêm provando que a regeneração cutânea é possível com o uso de células-tronco, provendo a redução da cicatriz,

restabelecendo a anatomia e fisiologia normais da pele. Essas pesquisas apontam que as células-tronco adultas podem ser utilizadas na regeneração de tecidos e órgãos em quase todas as lesões. O uso de células-tronco adultas nas pesquisas médicas, especialmente as mesenquimais (MSCs), tem sido requerido por mostrar bons resultados e afastar-se de diversos dos problemas relacionados às células-tronco embrionárias[1].

Os estudos atuais mostram que as MSCs têm a capacidade de diferenciação para locais específicos em resposta às sugestões fornecidas por diferentes microambientes[8]. MSCs ainda expressaram a proteína queratina ("*queratinócitoespecífica"*) e formam estruturas glandulares, tendo mostrado nas feridas, acelerada resolução e altos níveis de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e angiopoietina-1, sugerindo que o MSCs promoveu cicatrização através de uma contribuição direta e liberação de fatores pro-angiogênicos[9].

Embora um conhecimento recente, a diferenciação de células-tronco embrionárias ou adultas em diferentes linhagens celulares tem sido alvo de inúmeras pesquisas em todo o mundo. Além das células-tronco mesenquimais, grande parte dos trabalhos têm tido direcionamento às células-tronco da própria pele, tanto da fração interfolicular como das localizadas no bulge folicular, reconhecidamente com maior potencial de diferenciação em linhagens celulares diversas.

A regeneração da pele parece ser algo ainda de uma complexidade muito maior que a reprodução acontecida em uma cultura composta por um ou dois grupos celulares, sendo constante o direcionamento das mesmas aos "organotipos", com modelos tridimensionais e múltiplos contatos celulares.

Interessante lembrar que as pesquisas passam a uma fase de experimentação em fases *in vivo* e *in vitro*[10] onde células-tronco são injetadas em tecido vivo e posteriormente há a retirada cirúrgica de material que será "plaqueado" em cultura para análise do direcionamento da diferenciação das células injetadas inicialmente.

A pele mostra uma histologia complexa, composta de epiderme, derme e hipoderme, mostrando diversos grupos celulares (queratinócitos, melanócitos, células de Merkel, fibroblastos, adipócitos). A derme e a epiderme ainda mostram uma estrutura bem singular, a zona de membrana basal, com um especial arranjo entre colágeno I, III, IV e VII, elastina, laminina 5, integrinas, proteoglicanos e glicosaminglicanos. Os queratinócitos, as células preponderantes, ligam-se através de desmossomos e por meio das constantes divisões, ascendem até a superfície, onde atingem a camada córnea[11]. O que já nos remete às possíveis dificuldades em se "imitar" tão elaborado tecido.

A pele guarda pelo menos dois tipos de células-tronco, o primeiro com maior capacidade de diferenciação, presente na bulge folicular, próximo à glândula sebácea, já as células interfoliculares mostram menor poder de diferenciação, havendo trabalhos que mostraram estarem em percentual entre 2 a 7% na camada basal da epiderme[12]. Trabalhar com tais células pode ser bem mais atraente que empreendimentos científicos com células-tronco embrionárias ou mesmo as células-tronco adultas de outros órgãos, como medula óssea e cordão umbilical. O argumento que sustenta tal possibilidade referencia a menor tendência, dessas células, às diferenciações em outras linhagens, evitando problemas futuros em um enxerto ou engenharia tecidual para construção de pele artificial[7].

Contudo, trabalhar com célula-tronco requer conhecimento de suas funções, sobretudo no que diz respeito às suas possibilidades de diferenciação em diversas linhagens celulares. O primeiro passo a ser dado e firmado trabalha o desenvolvimento de um protocolo seguro, onde se possa realizar tal transformação com eficiência e segurança.

METODOLOGIA

A revisão sistemática foi planejada em duas etapas, a primeira utilizando-se os DESCRITORES: “stem cells”, “cell diferentiation”, “keratinocytes” e “cell culture techniques” (MESH TERMS) nos bancos de dados do PUBMED e BVS, quando se obteve 25 artigos, dos quais 3 (três) mostraram relevância aos objetivos do estudo.

Na segunda etapa o descritor (MESH/DECS) “cell culture techniques” foi retirado, obtendo-se uma amostra com 214 artigos, dos quais 9 (nove) observaram relação direta com nosso interesse.

Na primeira etapa foi observado um artigo de revisão sobre o mesmo tema, datado de 2005, publicado na EXPERIMENTAL DERMATOLOGY (vol. 14), com o título “Directing stem cell into the keratinocytes lineage *in vitro*”.

RESULTADOS

Neste trabalho de revisão consideramos apenas os artigos que tratavam de metodologia para a diferenciação de células-tronco embrionárias ou adultas que não fossem epiteliais, ou seja, não consideramos as células-tronco inseridas no bulge folicular ou mesmo na membrana basal interfolicular, embora tenhamos observado que quantidade substancial dos trabalhos pleiteava o tema. Contudo o nosso objetivo fora alinhavado apenas às células-tronco embrionárias e adultas não epidérmicas, com desenvolvimento para diferenciação *in vitro*.

Relacionamos em tabela os pontos principais das metodologias de diferenciação celular em queratinócitos, apontando 14 trabalhos aparecidos nas duas etapas da metodologia para a revisão sistemática.

Autor/Ano	Amostra	Utilização de meios e suplementos
ITOH *et al*, 2011.	Células-tronco adultas.	Uso de **ÁCIDO RETINÓICO** para promover o direcionamento ectodérmico e **PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA TIPO 4** para bloquear o destino neural. Ainda se utilizou um meio livre de soro de queratinócitos (**KSFM**).
BILOUSOVA, CHEN e ROOP, 2011.	Células-tronco pluripotentes.	Células-tronco são diferenciadas em uma linhagem de queratinócitos através de aplicações sequenciais de **ÁCIDO RETINÓICO** e **PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA-4**, crescendo em placas revestidas por **colagénio IV**.
SIVAMANI *et al*, 2011.	Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea.	Cocultura de células-tronco mesenquimais humanas com queratinócitos.
NISSAN, 2010.	Células embrionárias humanas.	Úso de **ÁCIDO ASCÓRBICO** e **PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA TIPO 4**.
GUENOU, 2009.	Células-tronco embrionárias de duas linhas - SA01 (Cellartis, Götenborg, Sweden) e H9 (Wicell, Madison, WI, USA)	Para a diferenciação mitomicina-C tratada com 3T3 fibroblastos em meio FAD (3:1 mistura de meio Dulbecco modificado por Eagle [DMEM] e meio de Ham F12) e 10% soro fetal bovino suplementado com 5 μg/mL **insulina**, 0,5 μg/mL **hidrocortisona**, 10^{-10} mol/L toxina colérica, 1,37 ng/mL **triiodotironina**, 24 μg/mL **adenina** e 10 ng/mL **fator de crescimento epidérmico** (recombinante humano). Diferenciação ectodérmica foi induzida por 0,5 nmol/L **PROTEÍNA MORFOGENÉTICA HUMAN RECOMBINANTE HUMANA TIPO 4** e 0,3 mmol/L **ÁCIDO ASCÓRBICO**.
METALLO *et al*, 2008.	Células-tronco embrionárias humanas.	Células-tronco embrionárias humanas postas em cultura com fibroblastos embrionários de ratos (MEFs), em meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM)/meio DE Ham F-12 contendo 20% de Knockout Serum Replacer, 1 X MEM aminoácidos não essenciais, 1 mM L-glutamina, 0,1 mM β-mercaptoetanol, e 4 ng/mL fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF). Alternativamente as células-tronco foram plaqueadas em MATRIGEL em meio contendo MEFs e passadas com Dispase. Durante as passagens de placas, foram usados meios livres de

		fatores de queratinócitos, combinações com DMSO, 1 µM de **ÁCIDO RETINÓICO** e 25 ng/ml **PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 4** (BMP-4) ou 125 ng/mL de Noggin.
HUANG *et al*, 2008.	Células-tronco do interior de blastocistos de ratos.	Em meio de cultura com MEF (células alimentadoras). A cultura foi lavada 3 vezes com solução salina (PBS), e tratada enzimaticamente com 2 ml de 0,25% de tripsina (wt/vol) – 0,02% EDTA (wt/vol) (Invitrogen) por T25 culture flask por 2 min a 37° C, colhida do meio de crescimento e passada em MEFs mitoticamente inativados.
JI *et al*, 2006.	Células-tronco embrionárias humanas.	Células-tronco foram postas em cultura com alimentador de células (MEF). As placas foram cobertas com 0,1% de solução de gelatina. A placa foi incubada durante a noite em 37^{o}C, com umidificação e 5% de CO_2 antes do plaqueamento do MEF. Células-tronco foram plaqueadas como colônias e cultivadas em meio (80% DMEM/F12 media, 20% Knockout Serum Replacement, 1% de solução de L-glutamina, 0,1 mM de mercaptoetanol, e 0,1 mM MEM solução de aminoácido não essencial) suplementado com 4 ng/mL de bFGF. Quando das passagens, 1 mL de colagenase foi adicionado ao meio (1 mg/mL de colagenase em DMEM/F12). As células foram então separada da placa. Corpos embrióides foram retirados da placa e semeados em meio definido livre de soro de queratinócitos (DSFM) e meio isento de soro queratinocítico (SFM) ou meio FAD (2,5% de clone fetal II, três partes de F12 para uma parte de DME, 0,4 µg/mL de hidrocortisona, 8,4 ng/ml toxina colérica, 5 µg/mL de insulina, 24 µg/ml de adenina, 10 ng/ml de fator de crescimento epidérmico e pen/strep). Cobertura das placas com gelatina a 0,1%, Matrigel, 10% de FBS, colageno I ou não foram cobertas. Hidrocortisona foi adicionada, em alguns experimentos a 0,4 µg/mL. Tripsina foi usada para remover a cultura em monocamada da placa. As células foram transferidas para meio com colageno I fixado em DSFM. Solução de cloridrato de cálcio foi adicionada ao DSFM em alguns experimentos, gerando 1 mM de concentração de cálcio.

KAMOLZ *et al*, 2006.	Células-tronco do cordão umbilical.	Cocultura com células-tronco e queratinócitos, em cola de fibrina com fibroblastos.
CORAUX *et al*, 2003.	Células-tronco embrionárias de ratos.	Células-tronco foram plaqueadas em meio formado por MATRIX EXTRACELULAR (acelular – matrix protéica) – células separadas com solução de EGTA/EDTA (deixando provavelmente fatores de crescimento e citocinas na matrix). Significante diferenciação a queratinócitos foi observada quando as células-tronco foram semeadas em ECM derivada de fibroblastos humanos normais ou de fibroblastos NIH-3T3 de ratos. Quando a **BMF-4** foi adicionada à cultura, observou-se um importante direcionamento a queratinócitos. Quando da adição de **ÁCIDO ASCÓRBICO**, não houve sinergismo à BMF-4, ou seja, não houve vantagem à sobrevivência dos queratinócitos sobre outros tipos celulares.
BAGUTTI *et al*, 2001.	Células-tronco embrionárias.	A diferenciação foi iniciada em meio contendo 20% de FCS. Foram semeados fibroblastos (HDF cocultura) e usados fatores de crescimento: FGF humano ácido/básico, KGF, FGF10, TGFa, TGFb1 e SF/HGF.
BAGUTTI *et al*, 1996.	Células-tronco embrionárias.	Células-tronco foram cultivadas meio alimentador de Mitomicin C, tratado com fibroblastos embrionários de ratos em meio Dulbecco modificado por Eagle, suplementado por 15% soro fetal bovino (FCS), 2 mM L-glutanina, aminoácidos não essenciais, 50U/mL penicilina/streptomicina e 50 μM de β-mercaptoetanol.

Quadro 1. Relação de autores e suas metodologias empregadas na diferenciação de células-tronco em queratinócitos.

DISCUSSÃO

Desenvolver protocolos eficientes para que haja uma diferenciação *in vitro*, promovendo um modelo que permita caracterização molecular e possíveis manipulações genéticas, são de importância crucial[7] ao desenvolvimento de estratégias para a engenharia tecidual.

A manipulação de células-tronco pode trazer, além das implicações éticas, problemas como a formação de tumores por distúrbios na diferenciação final das linhagens.

Observando as metodologias afixadas no quadro podemos comprovar ainda a inexistência de um protocolo simalar, ideal para o trabalho de diferenciação, contudo já observamos algum direcionamento, alguns encaminhamentos metodológicos com certa semelhança entre os autores, principalmente com relação ao uso de proteína morfogenética óssea tipo 4, ácido retinóico e ácido ascórbico.

A proteína morfogenética tipo 4, segundo ITOH, KIURU, CAIRO e CHRISTIANO, 2011, serve ao bloqueio do direcionamento da diferenciação das células-tronco à linhagem neural, já o ácido retinóico foi utilizado por esses pesquisadores para promover a diferenciação ectodérmica das células.

Metallo, em 2008, informa que o ácido retinóico usado em sua metodologia era um potente regulador da proliferação e diferenciação celular, sendo altamente envolvido no desenvolvimento embrionário, contudo sendo apresentado como um inibidor da diferenciação terminal dos queratinócitos *in vitro*, por modulação da p63.

Coraux, em 2003, informa que o ácido ascórbico atua como um eliminador de radicais livres, promovendo a proliferação mesenquimal, a síntese de colágeno, a diferenciação de fibroblastos e a sobrevivência de queratinócitos, contudo quando associado a preteína morfogenética não trouxe efeito aditivo ou sinérgico, quanto à sobrevivência dos queratinócitos. Já o artigo “Human

Embryonic Stem Cell-Derived Keratinocytes: How Close to Clinics?" indaga sobre a possibilidade de a combinação de ácido ascórbico e BMP4, usada por GUENOU, NISSAN, LARCHER, FETEIRA, LEMAITRE, SAIDANI *et al*, poderia gerar e manter uma população diferenciada relativamente menor de derivados epiteliais de células-tronco embrionárias humanas ou progenitores de longa vida em comparação com a proliferação mínima de derivados queratinocíticos descritas por trabalhos anteriores[28].

No trabalho de Nissan, 2010, não há informação sobre as funções do ácido ascórbico em sua metodologia.

Outra indicação importante observada nos trabalhos, em suas metodologias, foi a utilização de fatores de crescimento, matriz livre de queratinócitos e coculturas com fibroblastos e queratinócitos. HENG, CAO, LIU e PHAN também dissertam em sua revisão sobre formas de diferenciação das células-tronco em queratinócitos, citando estímulos físicos (campos elétricos e magnéticos, calor, forças mecânicas, irradiação, diminuição de umidade e baixa tensão de oxigênio), bem como a introdução de sinalizadores que induzam o acoplamento intercelular através de *gaps juncionais*, como dibutril cAMP, lipoproteínas de baixa densidade, dopamina, sulfato de condroitina, glicorticóides, inibidores de glicosilação e bloqueadores de condução de potássio como o tetraetilamonio e 4-aminopiridina.

Ainda, o artigo de Heng alerta que as coculturas carreiam um forte risco de transmissão de patógenos, em particular vírus. Tal informação é de interesse extremo, uma vez que vários estudos comprovam que as coculturas de fibroblastos estimulam muito a diferenciação de células-tronco em queratinócitos, estimulando assim sua feitura.

Os meios de cultura possivelmente são carreadores de fatores de crescimento e citocinas, mostrando um alto potencial para a diferenciação em queratinócitos, mesmo aqueles livres de tais células.

Um grande número de artigos tem como tema a pesquisa com células-tronco derivadas de precussores queratinocíticos, o que não foi objeto de nosso artigo, que buscou apenas diferenciação de células-tronco embrionárias ou adultas não epidérmicas (precursoras de queratinócitos) em cultura. Mesmo assim achamos importante informar que nesse viés temos o artigo de WU, QUONDAMENTTEO, LEFEVER, CZUCHRA, MEYER, CHROSTEK *et al*, de 2006, que estuda a diferenciação de células-tronco da pele, dentro do folículo piloso, requerendo a inibição da degradação de β-catenin, o que é controlado pelo complexo contendo axin e a proteína kinase GSK3β. No trabalho é mostrado que através do uso de um gen condicional em camundongo, a GTPase Cdc42 é decisiva para a diferenciação de progenitores da pele[29]. Em um outro artigo de 1997, Gandarillas e Watt demostram a participação da expressão de c-Myc na diminuição das divisões dos queratinócitos, mas com um aumento da diferenciação para essa linhagem, sem provocar apoptose[30].

Em abril de 2011, SUN, FU, HAN, ZHAO, LIU e SHENG mostraram a "dediferenciação" de queratinócitos a células-tronco precursoras de queratinócitos, *in vitro*, com fator de crescimento básico de fibroblasto, sem a intervenção genética. Essa nova célula demostrou β1-integrina, CK19 e CK14[31].

Ainda nessa linha de pesquisa, em 2004, ROH, TAO E LYLE isolaram células-tronco epiteliais e as colocaram em cocultura com células da papila dérmica para observar as mudanças na expressão gênica das células-tronco queratinocíticas, uma vez que tal interação é crucial para o desenvolvimento normal do folículo piloso[23].

Fortunel et al. (2010) realizaram procedimento para a diferenciação de células-tronco epidérmicas em queratinócitos utilizando uma mistura de meios com DMEM e Ham-F12 (3:1), mais soro fetal bovino, fator de crescimento epidermal (EGF), transferrina, insulina,

hidrocortisona, adenina, triiodothironina, L-glutamina, e mistura de antibióticos; essas culturas foram acondicionadas em placas com colágeno tipo I, fibroblastos e 5% de CO2.

Gniadecki, em 1997, mostrou a habilidade do $1,25(OH)_2D_3$ em induzir diferenciação terminal e inibir o crescimento de culturas com células-tronco queratinocíticas[24].

Por meio do trabalho "Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification", de 2005, ZANET, PIBRE, JACQUET, RAMIREZ, ALBORÁN e GANDARILLAS apresentam resultados que mostram uma função endógena da Myc na homeostase epidérmica. Seus dados apontaram que o Myc em células-tronco é incapaz de amplificar o tempo de vida e levam a um limitado tempo de vida em cultura, dando limitada proliferação de progenitores *in vivo*, embora uma correta atividade de Myc pareça ser essencial para uma renovação e função normais das células-tronco[34]. A redução do comportamento proliferativo leva a uma prematura diferenciação *in vivo* e em cultura.

O artigo de 2010, construído por TOAI, THAO, GARGIULO, THAO, THUY, TUAN *et al*, intitulado "*In vitro* culture of Keratinocytes from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: the Saigonese culture", que não foi encontrado pela metodologia da revisão sistemática, mas que por seu elevado valor elucidativo foi aqui acostado, trata da diferenciação de células-tronco mesenquimais obtidas do cordão umbilical, trabalho semelhante ao que nosso grupo realiza na Universidade Federal do Pernambuco. No artigo, após coleta e processamento das células-tronco mesenquimais, procede-se à cultura das células mononucleares, através de passagens sucessivas e utilização de PBS (solução divisora), bem como solução de tripsina-EDTA, incubação a temperaturas específicas (37^o C) com 5% de CO_2, além de IMDM-plus e 15% de soro fetal bovino (FBS), realizou-se centrifugação. Em seguida as células-tronco mesenquimais são induzidas a se diferenciarem em queratinóticos através da semeadura em meio

composto por combinação de PCM com SFM (1:9). Para confirmação da diferenciação foram realizadas colorações específicas (imunoflurescência) para K1-10 e p63 (anticorpo)[35].

O artigo de Nissan, 2010 (Les cellules souches pluripotentes font peau neuve), produziu um modelo tridimensional para utilização com enxerto, a maior parte dos outros artigos se limitou a realizar a transformação da célula-tronco em queratinócitos. Tal falta na metodologia traz poucos dados para o entendimento das alterações sofridas pelas células que estão em processo de diferenciação, como há no organismo, ou seja, um relacionamento entre células e estímulos.

A importância do conhecimento sobre a metodologia para as culturas apropriadas que forneçam tecidos de pele funcional, repousa sobre as necessidades claras, como bem informa LOFÊGO FILHO, DADALTI, SOUZA, SOUZA, SILVA e TAKIYA, no artigo de Revisão "Enxertia de pele em oncologia cutânea", publicado nos Anais Brasileiros de Dermatologia, em 2006. Dominar técnicas que ofereçam uma plataforma doadora de forma ilimitada, resolvendo situações próprias das dificuldades da utilização de práticas cirúrgicas ligadas à enxertia, como citam os trabalhos "Uso de esponja cirúrgica para curativo compressivo de enxerto cutâneo"[37], também publicado nos Anais, é uma necessidade médica.

Assim, trabalhos como os de YARAK e OKAMOTO (2010) que reiteram a necessidade de domínio das técnicas que levem às reparações e regenerações, têm sido cada vez mais importantes no meio científico.

CONCLUSÃO

1. Os artigos científicos estudados apontam, em sua análise, uma falta de seguimento protocolar unificado, embora alguns deles mostrem uma similaridade de técnica e objetivos.

2. Para que tenhamos segurança nas diferenciações celulares, principalmente no que tange à utilização de células tronco, com maior ou menor potencial de transformação em diversas linhagens celulares, necessitamos desenvolver modelos mais apropriados, que possam ser seguidos pela comunidade científica.
3. Tais modelos poderão referenciar os contatos celulares, a conexão a citocinas e fatores de crescimento, bem como o aspecto tridimensional dos tecidos, levando ao viés da cultura "organotípica", onde há o respeito às relações celulares.

REFERÊNCIAS

1. Fu X, Li H. Mesenchymal stem cells and skin wound repair and regeneration: possibilities and questions. Cell Tissue Res. 2009; 335(2):317-21.

2. Cartotto RC, Peters WJ, Neligan PC, Douglas LG, Beeston J. Chemical burns. Can J Surg. 1996; 39 (3): 205–211.

3. Sanchez R. Chemical and electrical burns. Rev Prat. 2002; 52 (20): 2234–2239.

4. Clark LD, Clark RK, Heber-Katz E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. Clin Immunol Immunopathol. 1998; 88:35–45.

5. Stocum DL. Tissue restoration through regenerative biology and medicine. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2004; 176:1–10.

6. Yoshikawa T, Mitsuno H, Nonaka I, Sen Y, Kawanishi K, Inada Y, Takakura Y, Okuchi K, Nonomura A. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. Plast Reconstr Surg. 2008; 121:860–877.

7. Heng BC, Cao T, Liu H, Phan TT. Directing stem cells into the keratinocyte lineage in vitro. Exp Dermatol. 2005;14(1):1-16

8. Fu XB, Fang LJ, Li XK, Cheng B, Sheng ZY. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. Wound Rep Reg. 2006; 14:325–335.

9. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. Stem Cells. 2007; 25:2648–2659.

10. Green H, Easley K, Iuchi S. Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(26):15625-30.

11. Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. Science. 1998; 279(5350):514-9.

12. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100 Suppl 1:11830-5.

13. Nissan X, Lemaitre G, Peschanski M, Baldeschi C. Pluristratified epidermis from human embryonic stem cells. Med Sci (Paris). 2010; 26(1):5-8.

14. Fortunel NO, Cadio E, Vaigot P, Chadli L, Moratille S, Bouet S, Roméo PH, Martin MT. Exploration of the functional hierarchy of the basal layer of human epidermis at the single-cell level using parallel clonal microcultures of keratinocytes. Exp Dermatol. 2010; 19(4):387-92.

15. Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault CC, Bernard FX, Peschanski M, Baldeschi C, Waksman G. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. Lancet. 2009; 374(9703):1745-53.

16. Sasahara Y, Yoshikawa Y, Morinaga T, Nakano Y, Kanazawa N, Kotani J, Kawamata S, Murakami Y, Takeuchi K, Inoue C, Kitano Y, Hashimoto-Tamaoki T. Human keratinocytes derived from the bulge region of hair follicles are refractory to differentiation. Int J Oncol. 2009; 34(5):1191-9.

17. Huang HJ, Gao QS, Tao BF, Jiang SW. Long-term culture of keratinocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2008; 44(7):193-203.

18. Fu XB, Shen ZY, Chen YL, He JH, Guo ZR, Zhang ML, Sheng ZY. Recombinant bovine basic fibroblast growth factor accelerates wound healing in patients with burns, donor sites and chronic dermal ulcers. Chin Med J. 2000; 113:367–371.

19. Itoh M, Kiuru M, Cairo MS, Christiano AM. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci. 2011; 108(21): 8797-802.

20. Bilousova G, Chen J, Roop DR. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into a multipotent keratinocyte lineage. J Invest Dermatol, 2011. 131(4): 857-64.

21. Sivamani RK, Schwartz MP, Anseth KS, Isseroff RR. Keratinocyte proximity and contact can play a significant role in determining mesenchymal stem cell fate in human tissue. FASEB J. 2011; 25(1): 122-31.

22. Metallo CM; Ji L; de Pablo JJ; Palecek SP. Retinoic acid and bone morphogenetic protein signaling synergize to efficiently direct epithelial differentiation of human embryonic stem cells. Stem Cells. 2008; 26(2): 372-80.

23. Ji L, Allen-Hoffmann BL, de Pablo JJ, Palecek SP. Generation and differentiation of human embryonic stem cell-derived keratinocyte precursors. Tissue Eng, 2006, 12(4): 665-79.

24. Kamolz LP, Kolbus A, Wick N, *et al*. Cultured human epithelium: human umbilical cord blood stem cells differentiate into keratinocytes under *in vitro* conditions. Burns. 2006; 32(1): 16-9.

25. Coraux C, Hilmi C, Rouleau M, *et al*. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells. Curr Biol. 2003; 13(10): 849-53.

26. Bagutti C, Hutter C, Chiquet-Ehrismann R, Fässler R, Watt FM. Dermal fibroblast-derived growth factors restore the ability of beta(1) integrin-deficient embryonal stem cells to differentiate into keratinocytes. Dev Biol. 2001; 231(2): 321-33.

27. Bagutti C; Wobus AM; Fässler R; Watt FM. Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. Dev Biol. 1996; 179(1): 184-96.

28. Pellegrini G, De Luca M. Human Embryonic Stem Cell-Derived Keratinocytes: How Close to Clinics? Cell Stem Cell 6. 2010.

29. Wu X, Quondamentteo F, Lefever T, Czuchra A, Meyer H, Chrostek A, *et al*. Cdc42 controls progenitor cell differentiation and catenin turnover in skin. Genes & Development. 2006; 20:571–585.

30. Gandarillas A, Watt FM. c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. Genes & Development. 1997; 11:2869–2882.

31. Sun X, Fu X, Han W, Zhao Y, Liu H, Sheng Z. Dedifferentiation of human terminally differentiating keratinocytes into their precursor cells induced by basic fibroblast growth factor. Biol. Pharm. Bull. 2011; 34(7) 1037—1045.

32. Roh C, Tao Q, Lyle S. Dermal papilla-induced hair differentiation of adult epithelial stem cells from human skin. Physiol Genomics. 2004; 19: 207–217.

33. Gniadecki R. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its 20-epi analogues (MC 1288, MC 1301, KH 1060), on clonal keratinocyte growth: evidence for di€ erentiation of keratinocyte stem cells and analysis of the modulatory e€ ects of cytokines. British Journal of Pharmacology. 1997; 120, 1119 ± 1127.

34. Zanet J, Pibre S, Jacquet C, Ramirez A, Alborán IM, Gandarillas A. Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification. Journal of Cell Science. 2005; 118, 1693-1704.

35. Toai TC, Thao DH, Gargiulo C, Thao NP, Thuy TTT, Tuan HM *et al*. *In vitro* culture of Keratinocytes from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: the Saigonese culture. Cell Tissue Bank. 2010.

36. Lofêgo FJA, Dadalti P, Souza DC, Souza PRC, Silva MAL, Takiya CM. Enxertia de pele em oncologia cutânea. An. Bras. Dermatol. 2006; 81(5): 465-472.

37. Zanini M, Machado FCDAS, Timoner F. Uso de esponja cirúrgica para curativo compressivo de enxerto cutâneo. An. Bras. Dermatol. 2004 ; 79(3): 359-362.

38. Yarak S, Okamoto OK. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. An. Bras. Dermatol. 2010; 85(5): 647-656.

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1. Biomateriais

O gel de biopolímero de cana-de-açúcar e as membranas desse biomaterial foram cedidos pelo grupo de pesquisa Biopolímeros de Cana-de-Açúcar, coordenado pelo Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar do Programa de Pós-graduação em Cirurgia do Hospital das Clínicas-CCS/UFPE.

O gel é obtido segundo metodologia de Santos-Magalhães *et al*.(2007).

5.2. Cultura de células-tronco

5.2.1 *Casuística e manuseio dos cordões umbilicais*

Cordões umbilicais foram obtidos de parturientes (n=40, com 36 a 40 semanas de idade gestacional), só após a assinatura de um termo de doação de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE (ANEXO 1). Os cordões coletados foram processados no período de seis a 12 horas depois do parto normal ou cesária, no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia-CCB/UFPE.

5.2.2 *Isolamento e cultura das células-tronco mesenquimais*

A veia de cada cordão foi canulada e lavada interiormente com solução tampão cordão (pH=7,4). Posteriormente, a parte distal do vaso foi clampeada e o mesmo preenchido com 0,1% de solução de colagenase IV (Sigma, St. Louis, MO, USA), quando então a parte proximal foi também ocluída. Após a incubação do cordão umbilical a 37 ^{o}C por 5 minutos, a veia foi gentilmente massageada e procedeu-se a drenagem da solução de colagenase contendo as células. Em seguida, a veia foi novamente preenchida com Meio Eagle modificado por Dulbecos (D-MEM, Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, HyClone) para a coleta do restante do material. A suspensão de células obtidas do cordão umbilical foi centrifugada até 400g e o sedimento celular ressuspendido em meio D-MEM suplementado com 20% de SFB e

mistura de antibióticos: 100U de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma). Posteriormente, as células foram contadas e plaqueadas a uma concentração de 10^5 células/mL, em garrafas de 25 cm^2 (Cellstar, Greiner/Germany) previamente revestidas com gelatina porcina (Sigma/USA) como controle e com o gel de biopolímero de cana-de-açúcar como novo suporte.

As culturas foram acompanhadas semanalmente através de sistema de vídeo-microscopia de contraste de fase (LEICA).

5.2.3 *Avaliação da densidade e sobrevivência das células*

A contagem e a viabilidade das células em cultura foram realizadas com o auxílio de câmara hematimétrica. Após a incubação, uma alíquota da suspensão de células foi retirada e diluída em Azul de Trypan (0,2%, Sigma). As células foram observadas em função de possíveis alterações morfológicas e contadas em Câmara de Neubauer. As células viáveis excluem este corante e apresentam-se com o aspecto translúcido; já as células mortas foram percebidas por exibirem uma coloração arroxeada.

5.3. Imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais

A confirmação da linhagem mesenquimal foi realizada através da citometria de fluxo (FACScalibur BD®) pela Profa. Dra. Marcia Bezerra da Silva do Departamento de Biofísica e Radiobiologia-CCB/UFPE, em colaboração com a Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ/PE). Foram utilizados anticorpos monoclonais, ou seja, marcadores de células mesenquimais (CD 29 e CD 44) e marcadores de células da linhagem hematopoiética (CD 34 e CD 45), que reconhecem antígenos específicos na membrana das células e que foram conjugados com moléculas fluorescentes (FITC).

5.4. Avaliação das características morfológicas das células-tronco mesenquimais

As culturas de células foram acompanhadas semanalmente através de sistema de vídeo-microscopia (LEICA) com o auxílio de microscópio de contraste de fase para verificação das características morfológicas. A evolução da morfologia foi semanalmente registrada através das capturas de imagem, no intuito de se comparar os aspectos dessas células desde o isolamento até as sucessivas passagens *in vitro*, levando-se em consideração os tipos de suportes utilizados no cultivo das mesmas (gel e membranas de polímero de cana-de-açúcar).

Já a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada após duas semanas de cultivo sobre as membranas do biopolímero. As células foram fixadas em solução de 0,5mL de glutaraldeído e 4,5mL de solução tampão (pH= 7,4) e, em seguida, preparadas de acordo com protocolo do setor de MEV no Setor de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami (LIKA), sob a coordenação dos pesquisadores: Dr. Luiz Carlos Alves e Dr. Fábio André Brayner dos Santos.

5.5. Diferenciação celular em queratinócitos

Os ensaios para diferenciação em queratinócitos foram realizados após a segunda passagem da cultura com $2x10^4$ de células em placas estéreis com 12 poços segundo a metodologia modificada de Toai *et al*. (2009; 2010): as CTMs foram induzidas a diferenciar-se em queratinócitos quando adicionado um meio composto pela combinação de DMEM/Ham's F12 (*Dulbecco's modified Eagle Médium*, mais Fator 12 de crescimento: 3:1, v/v), 15% de SFB (soro fetal bovino), 10 ng/mL de Fator Epidermal de Crescimento (EGF), hidrocortisona 0,4 mg/mL e 5 µg/mL de insulina; também foi adicionado mistura de antibióticos (penicilina/estreptomicina) por um período de duas semanas. As placas contendo o gel de biopolímero de cana-de-açúcar e as células em processo de diferenciação foram avaliadas com auxílio de microscópio invertido de contrate de fase (LEICA) e registro fotográfico através do sistema Motic (Câmera MOTICAN 2000).

6. RESULTADOS

6.1 Isolamento e cultivo de CTMs sobre a gelatina Porcina®

As colônias de células com morfologia fibroblastóide foram observadas nas placas de cultura logo após 72 horas (em torno de 3-4 dias) e a formação da monocamada ocorreu com cinco dias de cultivo, onde observamos o tapete celular com algumas áreas abertas a serem posteriormente preenchidas (Figuras 1A e 1B).

As células aderentes foram cultivadas até alcançarem uma confluência de 80-90%, como podemos notar na figura 1D (células com dez dias de cultivo).

A figura 1E representa uma subcultura de 1ª passagem, onde observamos células com morfologia alongada numa evolução temporal em relação ao cultivo inicial em torno de 14 dias. A figura 1F representa uma área ampliada do cultivo de 14 dias, com células alongadas e evidente processo de divisão celular.

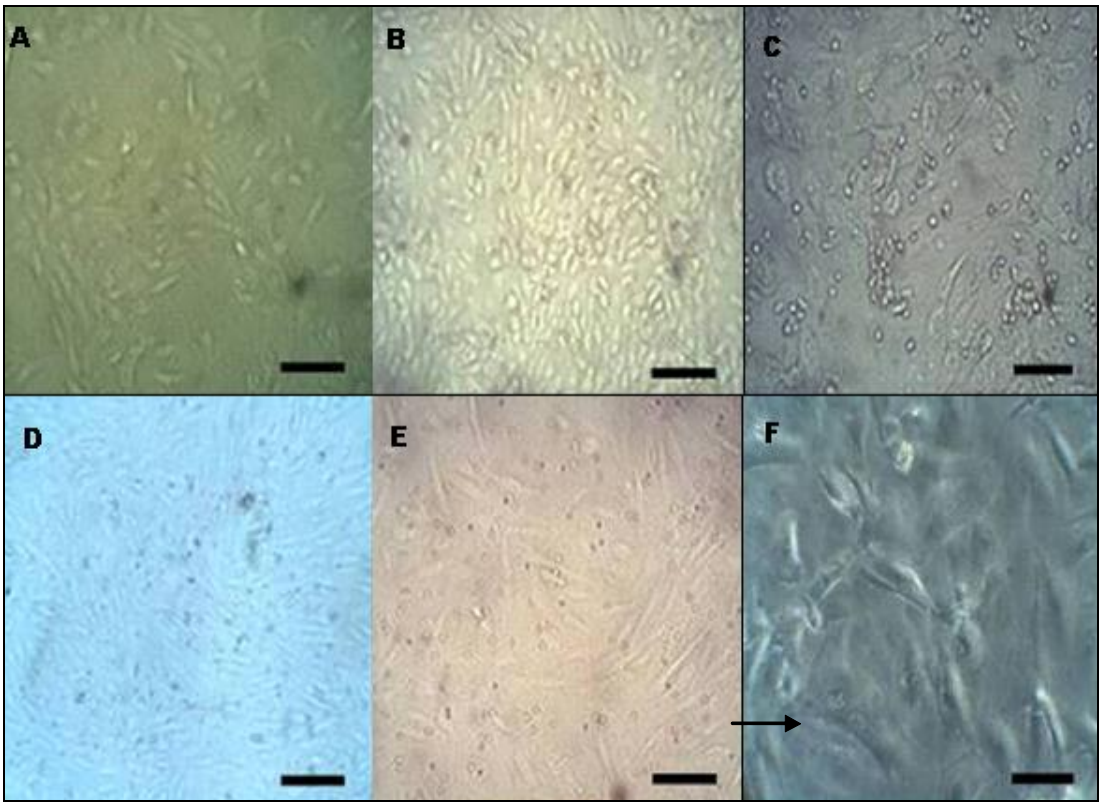

Figura 1. Fotomicrografias da evolução do cultivo de células-tronco de cordão umbilical humano realizadas com microscópio de contraste de fase: A) Células com aspecto fibroblastóide e algumas de forma arredondada são observadas com 72 horas de cultivo. B) Formação de monocamada após cinco dias de cultivo e C) Área ampliada da monocamada. D) Células confluentes com dez dias de cultivo E) Subcultura (1ª passagem): notar grande densidade de celulas com morfologia alongada, totalizando-se 14 dias a partir do cultivo inicial e F) Área ampliada do cultivo de 14 dias, com células alongadas e

evidente processo de divisão celular (**seta**). Escala de barra = 200 µm (A, B, D e E), 100 µm (C), 50 µm (F).

Os aspectos morfológicos das células fenotipicamente semelhantes às células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano em torno de 28 dias de cultivo foi descrito em função da capacidade de remodelação citoplasmática como mostrado na Figura 2. Essas células iniciam sua expansão de forma "*sui generis*" de acordo com o tempo de cultivo como mostram as figuras 2, 3 e 4 (28, 40 e 45 dias de cultivo, respectivamente).

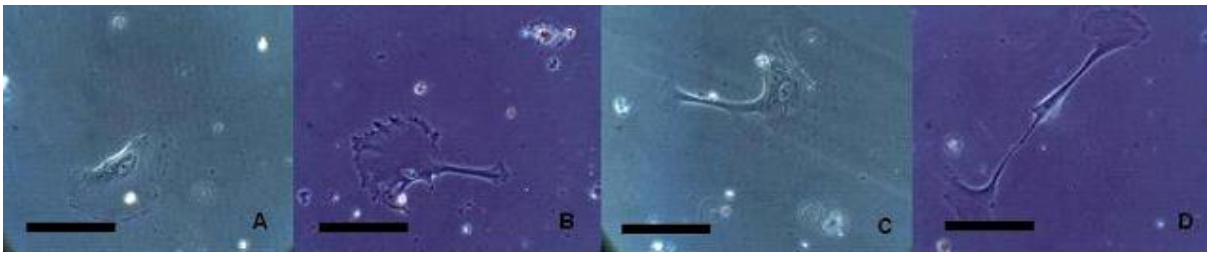

Figura 2. Cultura de células fenotipicamente semelhantes às células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano após 28 dias de cultivo: **A**) células com evidente expansão citoplasmática ao redor do núcleo. **B**, **C** e **D**) células com prolongamentos citoplasmáticos em forma de leque, núcleos ovais e mais de um nucléolo. Escala de barra = 100 µm.

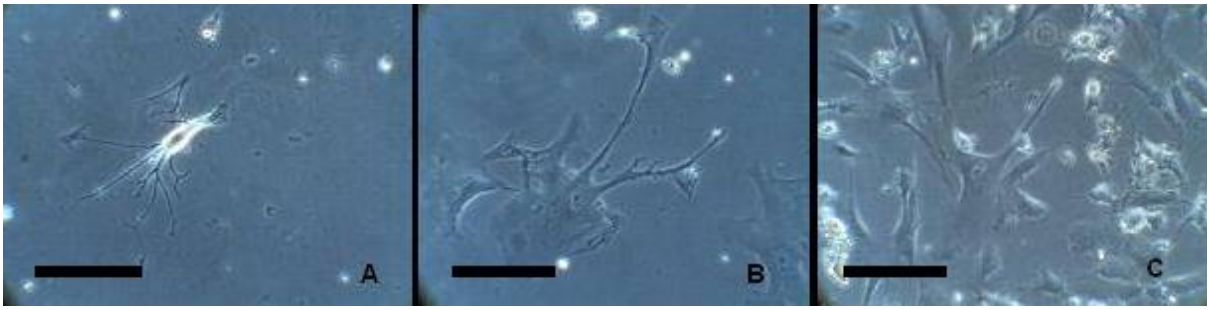

Figura 3. Cultura de células fenotipicamente semelhantes às células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano após 40 dias de cultivo. Células com prolongamentos citoplasmáticos ramificados e remodelação citoplasmática permitindo um aumento de comunicação celular. Escala de barra = 200 µm (A), 100 µm (B e C).

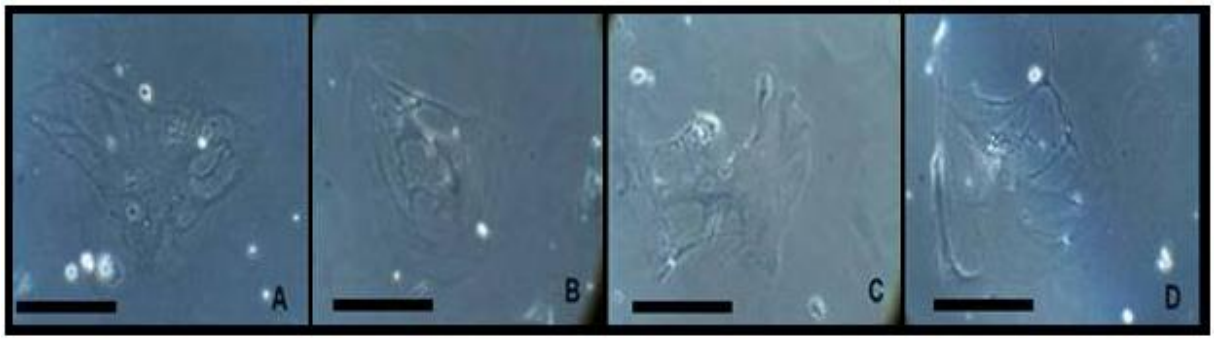

Figura 4. Cultura de células-tronco de cordão umbilical humano após 45 dias de cultivo. Célula com regiões citoplasmáticas rendilhadas. Escala de barra = 100 µm (A, B, C e D).

6.2. Análise da imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais

Todas as células do organismo apresentam um perfil de marcadores de superfície que caracterizam a singularidade biológica e a marca das células que os contêm (COVAS, 2006). Apesar da grande quantidade de marcadores positivos descritos na literatura não há para as CTMs um marcador positivo definido e definitivo. Sendo sua caracterização estabelecida pela identificação de uma combinação de marcadores específicos e não específicos (MEIRELLES *et al*., 2010).

Para a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) as CTMs são negativas para a expressão dos marcadores CD34, CD45 e CD14; crescem aderidas ao substrato, são cultiváveis por longos períodos e capazes de se diferenciar em pelo menos duas linhagens celulares. Há na literatura, um consenso de que as CTMs expressam níveis variáveis de CD44 e também têm expressão positiva para a molécula de adesão CD29 (BYDLOWSKI *et al*., 2009).

A análise imunofenotípica deste estudo revelou expressão positiva para marcadores moleculares de superfície como CD 44 (receptor de hialuronato) e CD 29 (molécula de adesão da superfamília das Integrinas – VLA beta). Além do que, foi confirmada expressão negativa para marcadores típicos de linhagens hematopoiéticas e endoteliais, como CD 34 (receptor de células endoteliais) e CD 45 (presentes em todas as células hematopoiéticas); confirmando-se assim o que é mencionado na literatura.

6.3. Cultivo das células-tronco mesenquimais sobre o gel de biopolímero de cana-de-açúcar

O uso do biopolímero de cana-de-açúcar como um novo suporte de cultivo das CTMs do cordão umbilical humano sustentou o crescimento de colônias celulares com morfologia alongada em disposição radial e a confluência de células fibroblastóides foi evidente com sete dias do início da cultura (Figura 5).

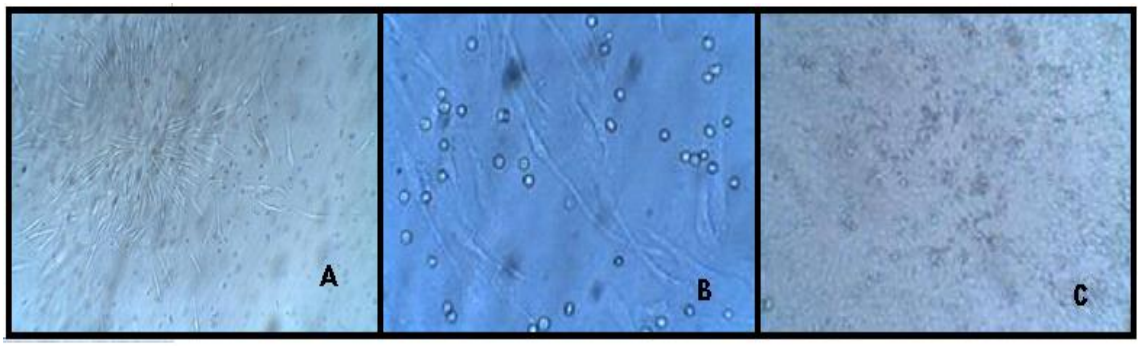

Figura 5. Fotomicrografias da evolução do cultivo de CTMs cultivadas sobre o gel de biopolímero de cana-de-açúcar avaliado através de microscópio com contraste de fase: A) Células fibroblastóides dispostas em arranjo radial, observáveis com 72 horas de cultivo (100x). B) Ampliação de parte das células em arranjo radial, destacando a morfologia alongada das mesmas (200x). C) Colônias fibroblastóides com sete dias de cultivo (100x).

6.4. Cultivo das células-tronco mesenquimais sobre membranas de biopolímero de cana-de-açúcar

O cultivo de CTMs do cordão umbilical humano sobre membranas do biopolímero de cana-de-açúcar revelou crescimento de colônias celulares, onde as células apresentaram formato variando de arredondadas (maior parte) a fibroblastóides (Figura 6) e evidente biocompatibilidade (80-90 %) em função do processo de confluência estabelecido por volta de sete dias (Figura 7).

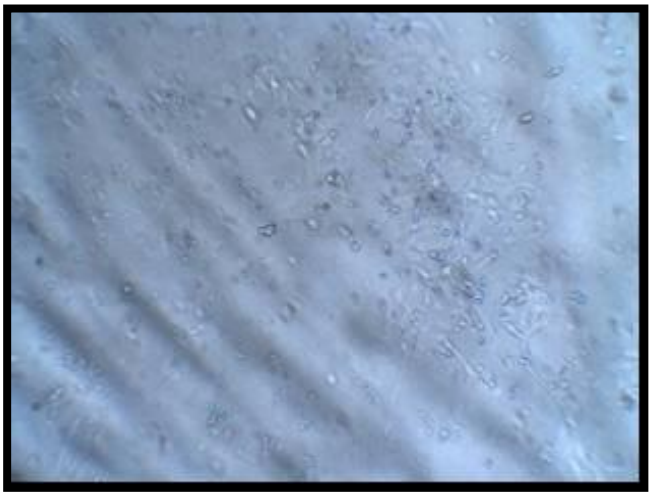

Figura 6. Fotomicrografia da evolução do cultivo (em torno de cinco dias) de CTMs de cordão umbilical humano sobre membrana de biopolímero de cana-de-açúcar: A) células com formato variando de arredondadas (maior parte) a fibroblastóides (100x).

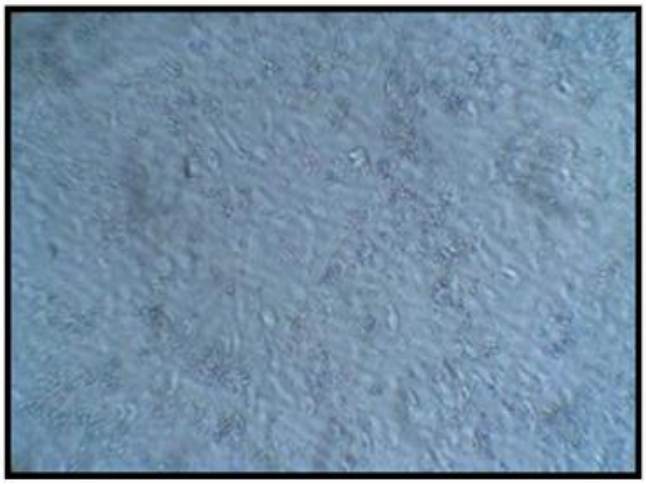

Figura 7. Fotomicrografia da evolução do cultivo (com 07 dias) de CTMs de cordão umbilical humano sobre membrana de biopolímero de cana-de-açúcar: A) células em processo de confluência sobre o novo suporte (100x).

6.5. Cultivo das CTMs na ausência de diferenciadores em membranas de biopolímero de cana-de-açúcar avaliadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Aspectos evidenciados através da microscopia eletrônica de varredura caracterizam de forma tridimensional os variados formatos das CTMs quando cultivadas sobre as membranas de biopolímero de cana-de-açúcar, algumas se apresentam com formas arredondadas e outras irregulares (Figura 8).

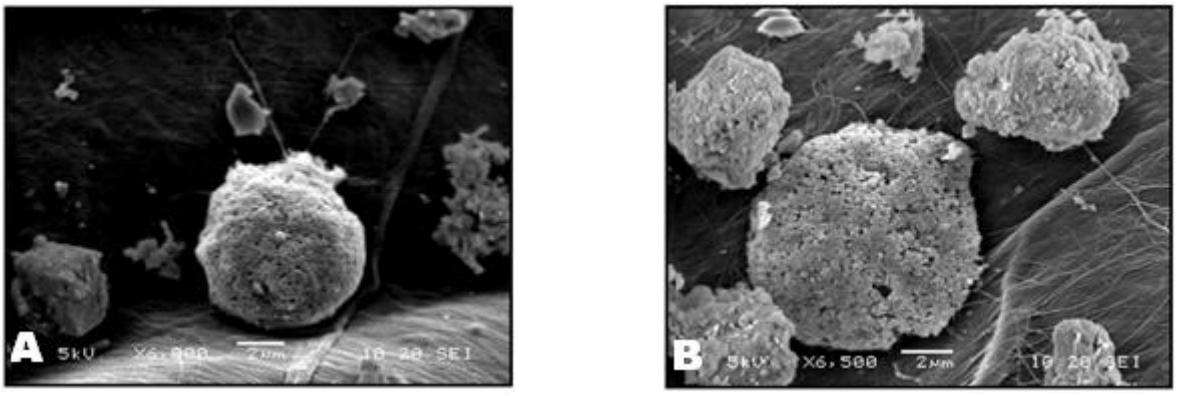

Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura de células-tronco mesenquimais (CTMs) sob a membrana de biopolímero de cana-de-açúcar. É possível observar a morfologia arredondada das células e algumas com aspecto irregular com emissão de finos prolongamentos (A e B).

Observamos ainda (na MEV) que as CTMs emitem finas conexões citoplasmáticas (nanofibras) em direção a malha do biopolímero de cana-de-açúcar, permitindo sua ancoragem nesse biomaterial e a comunicação com as células adjacentes (Figura 9).

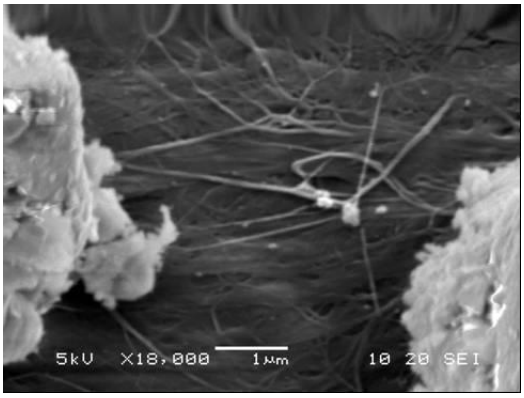

Figura 9: Micrografia de microscopia eletrônica de varredura de células-tronco mesenquimal (CTM) cultivada em membrana de biopolímero de cana-de-açúcar. Finas conexões celulares (***nanofibras***) são observadas em direção à malha do biopolímero de cana-de-açúcar e também interconexões entre as células.

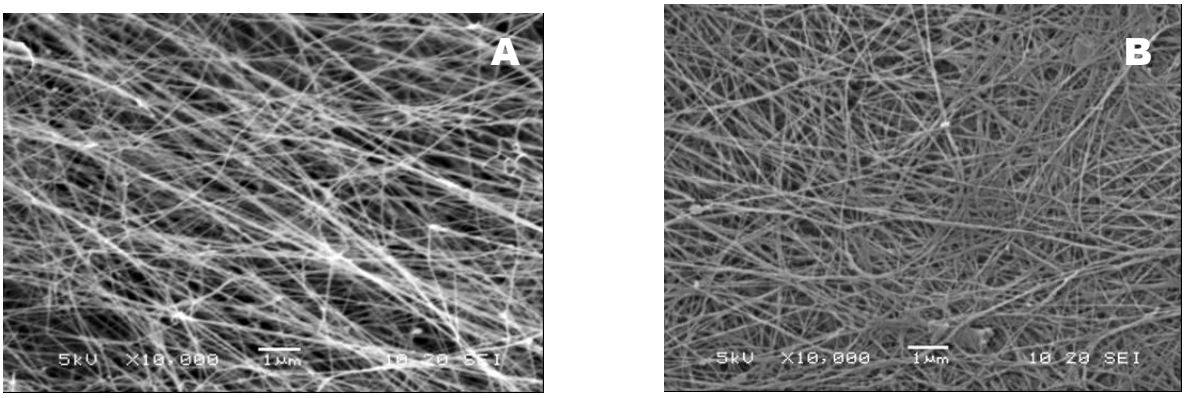

Figura 10: Micrografias de microscopia eletrônica de varredura detalhando superfície da membrana do biopolímero de cana-de-açúcar. **A**) Nota-se o aspecto entrelaçado das finas conexões celulares (***nanofibras***) e **B**) Representação exclusiva da malha do biopolímero de cana-de-açúcar com longas fibras entrelaçadas e dispostas homogeneamente.

6.6. Culturas de células-tronco mesenquimais sob ação de diferenciador para células epiteliais (queratinócitos) no gel de biopolímero de cana-de-açúcar avaliadas através da Microscopia Invertida por Contraste de Fase

A escolha do gel de biopolímero de cana-de-açúcar com suporte das CTMs para o referido ensaio se deu em função da necessidade da montagem de uma base de sustentação mais coesa para as células se firmarem mimetizando-se uma possível "membrana basal" e conseqüentemente

iniciarem a diferenciação para células fenotipicamente programadas para queratinização. Todavia, mesmo montando esse alicerce, observamos que o gel de biopolímero de cana-de-açúcar ao ser espalhado no fundo dos poços das placas de cultura tem a tendência de absorver o meio de cultura, segmentando-se em algumas áreas na forma de grumos e de aspecto amorfo. Logo, observamos que, inicialmente, grande parte das células conservou a morfologia arredondada nas condições preconizadas e apresentaram-se ora de forma enfileirada em algumas áreas do novo biomaterial, como também espalhadas no referido gel (Figura 11). Em torno de 14 dias, sob efeito da indução estabelecida, a típica forma cubóide-arredondada das colônias de células semelhantes aos queratinócitos foram observadas nas culturas (Figura 12).

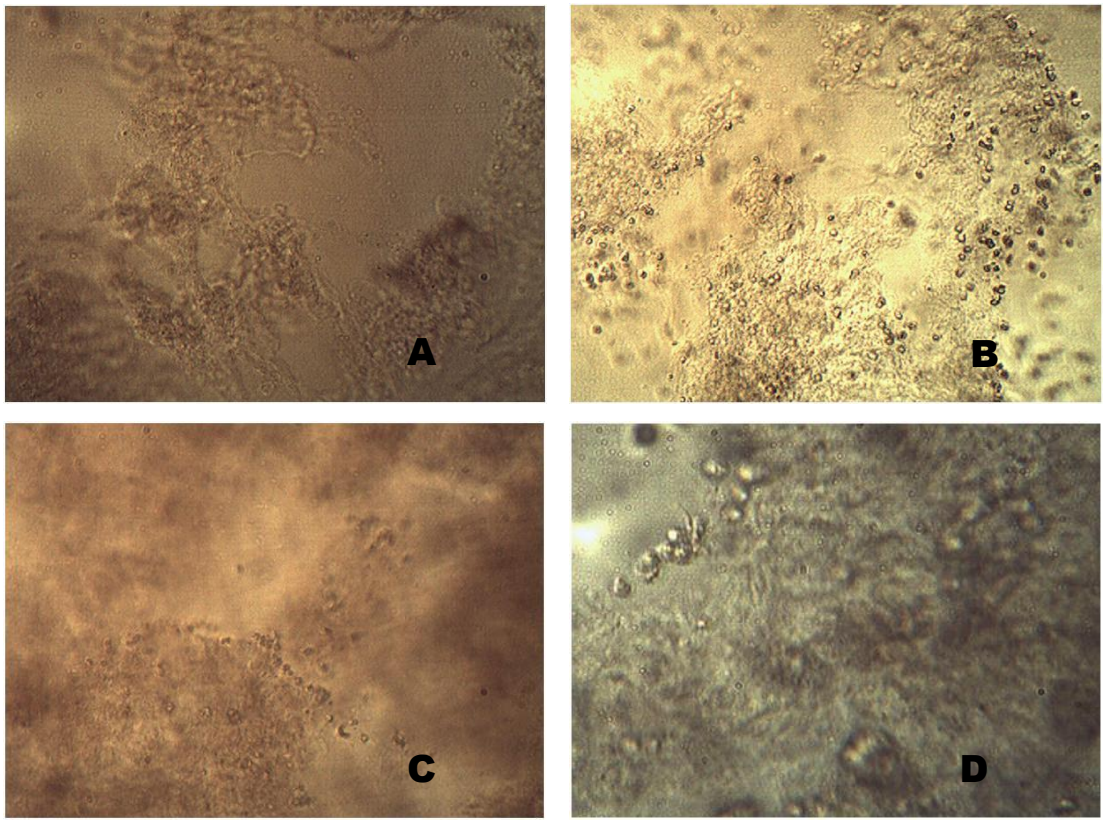

Figura 11: Cultura de CTMs com uma semana sob a influência de diferenciador para células epiteliais (queratinócitos) no gel de biopolímero de cana-de-açúcar, avaliadas através de microscópio invertido por contraste de fase. **A**) Gel de biopolímero de cana-de-açúcar (em grumos) sem células. **B**) CTMs semeadas sobre o biomaterial; **C**) Nota-se a disposição das células em fileira na borda de alguns grumos do referido gel (200x). **D**) Ampliação (200x) de um conjunto de células enfileiradas e alguns conglomerados no interior do gel de cana-de-açúcar. **A** e **B** (100x).

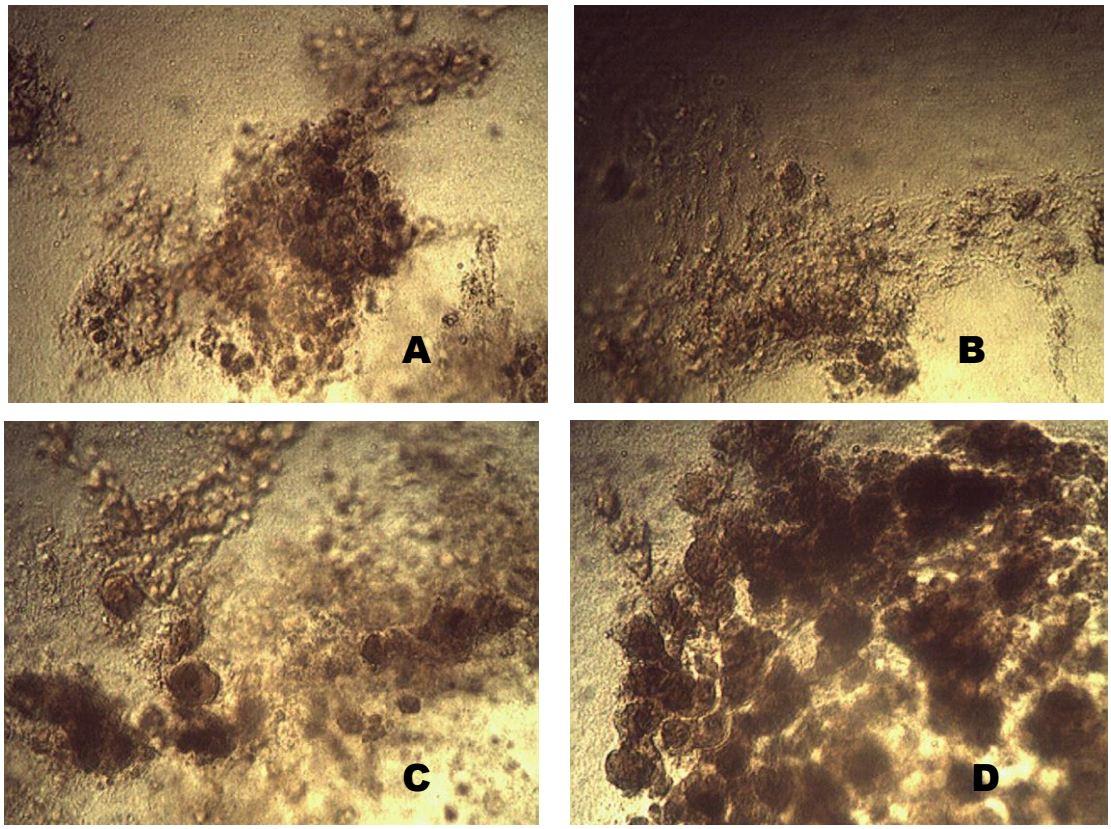

Figura 12: Cultura de CTMs com duas semanas sob a influência de diferenciador para células epiteliais (queratinócitos) no gel de biopolímero de cana-de-açúcar, avaliadas através de microscópio invertido por contraste de fase. **A**) Gel de biopolímero de cana-de-açúcar (em grumos) com células e sob ação do diferenciador. **B**) Gel de biopolímero de cana-de-açúcar (em grumos) com CTMs semeadas sobre o biomaterial; **C**) nota-se a disposição das células em fileira em alguns grumos do referido gel (200x). **D**) Ampliação (200x) de um conjunto de células cubóide-arredondadas no gel de biopolímero de cana-de-açúcar. **A** e **B** (100x).

7. DISCUSSÃO

A engenharia de tecidos está voltada para o desenvolvimento de novos materiais ou dispositivos com capacidade de formar interações específicas com os tecidos biológicos (CROCE, *et al*., 2004). Logo, as pesquisas nessa área do conhecimento têm se intensificado na busca de novas classes de polímeros biodegradáveis com bioatividade específica e controlável (MADIHALLY *et al*., 1999), que possam ser utilizados como suporte para cultura celulares (NEHRER *et al*., 1997, DEE *et al*., 1998; ANSELME, 2000).

Biopolímeros que contêm carboidratos apresentam altas taxas de biocompatibilidade devido às semelhanças com os tecidos vivos (KAPLAN, 1998). Em estudos prévios a estrutura química do biopolímero de cana-de-açúcar foi determinada, observando-se em sua constituição diferentes monossacarídeos: glicose 87,57%, xilose 8,58%, ribose 1,68%, ácido glicurônico 0,83%, manose 0,82%, arabinose 0,37%, galactose 0,13%, ramnose 0,01% e fucose 0,01% (CASTRO *et al*., 2004).

O biopolímero de cana-de-açúcar tem se apresentado como um biomaterial de grande interesse para inúmeros grupos de pesquisa que visam o emprego do mesmo em diferentes áreas de investigação. Esse biomaterial tem sido produzido a partir uma matéria-prima abundante e renovável, como plantios comerciais de cana-de-açúcar da região Nordeste do Estado de Pernambuco (CASTRO *et al*., 2004). Portanto, pesquisas dirigidas à utilização do biopolímero de cana-de-açúcar como suporte para o cultivo de células-tronco (CTs), estão começando a despontar como um novo procedimento dentro da área de biomateriais (LIMA *et al*., 2005).

A interação dos tecidos e fluídos do corpo com os biomateriais constitui um mecanismo de fundamental importância para a engenharia de tecidos (FEDERMAN *et al*., 2009). Neste contexto, a formação de uma matriz é essencial para a constituição de um arcabouço necessário no transporte de nutrientes, oxigênio e resíduos metabólicos; e essa matriz deve ser biocompatível, não irritante e resistente (PÉRTILE *et al*., 2007).

Os componentes de um suporte utilizado no cultivo de células parecem ativar a morfogênese das mesmas, enquanto este é gradualmente degradado e substituído pelo tecido regenerado (SOARES *et al*., 2007). Estudos referem que a adesão celular é um dos pré-requisitos para a proliferação e diferenciação celular antes da formação do tecido; desse modo, o grau de adesão celular determina o sucesso de um biomaterial (SOARES *et al*., 2007).

Os aspectos morfológicos evidenciados em nossos resultados revelaram a forma fibroblastóide das células com prolongamentos citoplasmáticos mais alongados buscando ancoragem em varias direções e conseqüentemente ampliando o contato entre as mesmas. Em função dessa constatação foi sugerido que essa plasticidade conferida pela adesão e proliferação celular, favoreceu o estabelecimento da biocompatibilidade semelhante àquela observada com suportes comercialmente utilizados. Nossos achados são reforçados por trabalhos da literatura que referem o processo inicial de adesão celular a uma superfície caracterizado por ligações fracas, passando pelo espraiamento celular que favorece a formação de ligações fortes entre a célula e o substrato (PÉRTILE *et al*., 2007; FEDERMAN *et al*., 2009).

Os suportes biológicos utilizados *in vitro* têm a finalidade de manter o crescimento celular para o possível desenvolvimento de novos tecidos. Desta forma, uma resposta celular adequada, adesão e espraiamento, após a implantação de substratos biológicos são consideradas essenciais para a engenharia tecidual (CHEN *et al*., 2005). No estudo que realizamos a hipótese de que o biopolímero de cana-de-açúcar poderia ser utilizado como novo suporte para cultivo de CTMs, em substituição àqueles comercialmente utilizados (como a gelatina Porcina®), foi confirmado.

Os suportes para crescimento das células podem ser configurados como de forma fechada ou aberta. Os suportes fechados criam um microambiente para o crescimento das células implantadas e as protegem do reconhecimento e agressão do sistema imunológico; os suportes abertos permitem a incorporação de novas células ao tecido, estimulando a reparação tecidual. Para evitar qualquer processo de rejeição, o ideal seria associar os suportes abertos a drogas imunossupressoras ou a células autólogas (STASHOWER *et al*., 1999; ANSELME, 2000; CHEN *et al*., 2005.

Diversos estudos têm demonstrado dois pontos cruciais no que se refere à relação das CTMs com o sistema imune; uma vez que, elas apresentam baixa imunogenicidade (DEANS; MOSELEY, 2000; DI NICOLA *et al*., 2002; KRAMPERA, 2002) e parecem modular o sistema imune (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; RASMUSSON, 2006; UCCELLI *et al*., 2007). Em virtude dessas condições, a aplicação das CTMs em combinação com os biomateriais para a engenharia tecidual, possivelmente não exigiria a utilização de drogas co-adjuvantes como os imunossupressores.

A possibilidade de se obter queratinócitos a partir de células mesenquimais oriundas do sangue de cordão umbilical humano surgiu em função da habilidade dessas células se

diferenciarem em diferentes fenótipos celulares e por apresentarem ações antiinflamatórias e imuno-modulatória que são cruciais especialmente na produção de enxertos para a regeneração da pele (TOAI *et al*., 2010).

As características das CTMs as tornam uma fonte celular promissora para a engenharia tecidual. As CTMs têm a capacidade de se diferenciarem em células específicas do tecido mesenquimal, podendo produzir células dos diferentes tecidos como ósseo, cartilaginoso, muscular, medular, entre outros (PHINNEY *et al*., 2007; YAMASAKI *et al*., 2008). Essas células também secretam uma grande variedade de moléculas bioativas que podem regenerar o microambiente tecidual na área da injúria (SERRANO *et al*., 2004; CHEN *et al*., 2005). Assim, as CTMs são propostas como uma nova ferramenta para a reparação de defeitos no tecido mesenquimal, utilizando-se os princípios e práticas da engenharia tecidual (KAPLAN, 1998).

Os biomateriais devem apresentar cinco propriedades para a aplicação na engenharia tecidual como; biocompatibilidade, capacidade de suportar o crescimento celular, orientar e organizar as células, possibilitar a proliferação, ao mesmo tempo em que devem manter a difusão de fatores de crescimento e resíduos, e por último, quando a função tecidual estiver restabelecida, serem degradados sem provocar efeitos colaterais (BOROJEVIC, 2004). Dessa forma, os biomateriais utilizados na engenharia tecidual devem ser capazes de prover proliferação celular, e a adequação do microambiente no local da implantação sendo de fundamental importância para que a interface célula-biomaterial possa ocorrer naturalmente (COVAS, 2006).

O tipo de cultura que apresentamos neste estudo, nos permitiu avaliar a morfologia das CTMs e suas interações célula-célula e célula-matriz numa condição usualmente realizada *in vitro*, ou seja, o cultivo em monocamada utilizando como novo suporte o biopolímero de cana-de-açúcar. Nosso trabalho corrobora com outros da literatura, no que concernem ao avançar da tecnologia, onde muitos autores têm enfatizado a necessidade de serem desenvolvidos dispositivos tridimensionais que possam inovar as pesquisas direcionadas a regeneração de órgãos e tecidos (BOROJEVIC, 2004, PHINNEY; PROCKOP, 2007; MONTEIRO *et al*., 2008; KOLF *et al*, 2007; HODGKINSON; BAYAT, 2011). Sendo assim, a necessidade de melhor caracterizarmos o processo de diferenciação das CTMs do cordão umbilical em queratinócitos quando cultivadas em gel de biopolímero de cana-de-açúcar, parece promissora e deve ser incentivada, podendo abrir novas perspectivas de aplicações no campo da engenharia tecidual.

8. CONCLUSÕES

8.1. O isolamento e cultivo das CTMs foram estabelecidos sobre os novos suportes de biopolímero de cana-de-açúcar (gel e membranas).

8.2. As CTMs aderiram e proliferaram sobre os novos suportes de biopolímero de cana-de-açúcar, exibindo uma das propriedades essenciais a um verdadeiro biomaterial, a biocompatibilidade.

8.3. Os novos suportes estudados para cultivo das CTMs favoreceram o crescimento de células fibroblastóides e a remodelação citoplasmática pode ser observada com o evoluir da cultura, não diferindo daqueles comercialmente utilizados.

8.4. As CTMs foram capazes de se diferenciarem em células semelhantes aos queratinócitos no gel de biopolímero de cana-de-açúcar. Todavia, mais estudos deverão ser realizados para melhor caracterizar o referido processo; uma vez que, possivelmente, esse modelo metodológico possa fornecer uma fonte eticamente não controversa e facilmente acessível de queratinócitos para futuras aplicações experimentais e clínicas.

9. PERSPECTIVA

O uso da imunocitoquímica far-se-á importante na identificação dessas células que sofreram diferenciação, podendo-se ter maior especificidade e sensibilidade na detecção das células queratinocíticas.

10. REFERÊNCIAS

AGGARWAL S, PITTENGER M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell reponses. **Blood**, v. 105, p.1815-1822, 2005.

AGUIAR, J.L.A.; LINS, E.M.; MARQUES, S.R.B.; COELHO, A.R.B.; ROSSITER, R.O.; MELO, R.J.V. Sugarcane biopolymer patch in femoral artery angioplasty on dogs. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 22, p. 77-81, 2007.

ALPETER, H.; BEVIS, M.J.; GRIJPMA, D.W.; FEIJEN, J. J. **Mater. Sci. Mater. Med**., v. 15, p. 175, 2004.

ANBIO-ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Disponível em: <www.anbio.org.br/> Acesso em: 12 maio de 2010 Atala, A.; Lanza, R. – **Methods of Tissue Engineering,** Academic Press: Florida, 2002.

ANSELME, K Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21; n. 7; p. 667-681, 2000.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **J Cell Mol Med**., v. 8, n.3, p. 301-316, 2004.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A.; DUEK, E. A. R. **Polímeros Biorreabsorvíveis matériaux-procédés propriétés**. **Habilitation à diriger dês recherches**. Reims: Université de Reims, Champagne-Ardenne, 2002. 46pp.

BARROS, L.A. Monografia de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas/Bacharelado): **Aspectos morfológicos de células-tronco mesenquimais cultivadas sobre suportes de biopolímero de cana-de-açúcar**. UFPE Recife/PE, 2010, 47pp.

BOROJEVIC, R. Terapias Celulares e Bioengenharia. **Gazeta Média da Bahia**, v. 78, n. 1, p. 42-46, 2008.

BOROJEVIC, R.; BALDUINO, A. Terapias celulares e Bioengenharia Tecidual. In : MIR, L. (Org.). **GENOMICA**. São Paulo: Atheneu, 2004. 1114 pp.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. Rev. Bras. **Hematol. Hemoter**., v. 31, n.1, p. 25-35, 2009.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I.A.; KUMAR, S. *et al*. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and boné marrow. **Blood**, v. 98, p. 2396-2402, 2001.

CAPLAN, A.I. All MSCs are pericytes? **Cell Stem Cell**, v.3, p.229-230, 2008.

CASTRO, C.M.M.B.; AGUIAR, J.L.A.; MELO, F.A.D.; SILVA, W.T.F.; MARQUES, E.; SILVA, D.B. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb**. v. 49, n.2, p. 119-123, 2004.

CAVALCANTE, A.H.M., CARVALHO, J. L.B., CARNEIRO-CUNHA, M. G. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 258-261, 2007.

CHAGAS, H. M. ; AGUIAR, J. L.; MONTORO, M. ; VILAR, F. ; PIRES, J.A. ; PEREIRA, L.A. ANDRADE, R.; LIMA, S.V. C. **International Brazilian Journal of Urology**. 32:2, 65-67, 2006.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**., v. 25, n. 11, p. 2739-2749, 2007.

CHEN, G.Q.; WU, Q. The application of polydroxyalkanoates as tissue engineering material. **Biomaterials**, v. 26; n. 33; p. 6565-65-78, 2005.

CIVIN, C.I. Commitment to biomedical research: clearing unnecessary impediments to progress**.** **Stem Cells**, v. 20, p. 482-484, 2002.

CLARK, L.D; CLARK, R.K; HEBER-KATZ, E. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. **Clin Immunol Immunopathol**., v. 88, p. 35–45, 1998.

COELHO, M.C.O.C; CARRAZONI, P.G; MONTEIRO, V.L.C; MELO, F. A. D; MOTA, R; TENÓRIO FILHO, F. Biopolímero Produzido a Partir da Cana-de-Açúcar para Cicatrização Cutânea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n. 1, p. 1-7, 2002.

CORCIONE, A. *et al*. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v. 107, p. 367-372, 2006.

COVAS, D.P.; SIUFI, J.L.C.; SILVA, A.R.L.; ORELLANA, M.D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 1179-1183, 2003.

COVAS, D.T. Células-tronco mesenquimais. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 35-48.

CROCE, M.A.; SILVESTRI, C.: GUERRA, D.; CARNEVALI, E.; BORALDI, F.; TIOZZO, R.; PARMA, B. Adhesion and proliferation of human dermal fibroblasto n collagen matrix. **J. Biomater Appl**., v. 18; p. 209-222, 2004.

CZAJA, W.; KRYSTYNOWICZ, A.; BIELECKIA, S.; MALCOLM, R.B. **Journal of Biomaterials**, 27: 145-151, 2006.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cell: biology and potential clinical use. **Exp. Hematol**., v. 28, p. 875-884, 2000.

DEL CARLO, R.J. *et al*. Integração de aloenxertos ósseos corticais associados ou não a células-tronco da medula óssea, proteína óssea morfogenética (BMP) e autoenxerto esponjoso em cães. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, p.204-215, 2007.

DEVINE, S.M. Mesenchymal stem cells: Will they have a role in the clinical? **J. Cell Biochem Suppl**., v. 38, p. 73-79, 2002.

DEWEZ, J.L.; LHOEST, J.B.; DETRAIT, E.; BERGER, V.; DUPONT-GILLAIN, C. C.; VINCENT, L.M.; SCHNEIDER, Y.J.; BERTRAND, P.; ROUXHET, P.G. **Biomaterials**, 1998, 1441 pp.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P.D.; MATTEUCCI, P.; GRISANTI, S.; GIANNI, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v.99, p. 3838-3843, 2002.

DONATH, K.; SPIEKERMANN, H.; HASSEL, T.; JOVANOVIC S. e RICHTER J. **Procedimentos cirúrgicos**, 1ª. Ed. São Paulo, Santos Editora, 2000, 157 pp.

EMERSON-BEEDLE, M.; KENNEDY, J.F.; MELO, F.A.D.; LLOYD, L.L.; MEDEIROS, V. **Carbohydrate Polymers**. 42, 375-383, 2000.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br. J. Haematol**., v. 109, p. 235-242, 2000.

FALCÃO, S.C; COELHO, A.R.B; EVÊNCIO NETO, J. Biomechanical evaluation of microbial cellulose (*Zoogloea* sp.) and expanded polytetrafluoroethylene membranes as implants in repair of produced abdominal wall defects in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 186-191, 2008.

FEDERMAN, S. R.; MANSUR, H. S.; STANCIOLI, E. F. B.; VASCONCELOS, W. L. Avaliação da biocompatibilidade do compósito aço/filme bioativo SiO_2-CaO para aplicação biomédica. **Cerâmica [online]**, v. 55, n. 335, p. 257-262, 2009.

FORTUNEL, N.O; CADIO, E., VAIGOT, P; CHADLI, L; MORATILLE, S; BOUET, S; ROMÉO, P.H; MARTIN, M.T. Exploration of the functional hierarchy of the basal layer of human epidermis at the single-cell level using parallel clonal microcultures of keratinocytes. **Exp Dermatol**., v. 19, v. 387-392, 2010.

FRIEDENSTEIN, A.J.; DERIGLAZOVA, U.F. KULAGINA, N.N. *et al*. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Exp. Hematol**., v. 2, p. 83-92, 1974.

FU, X.B; FANG. L.J; LI, X.K; CHENG, B; SHENG, Z.Y. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. **Wound Rep Reg**., v. 14, p. 325–335, 2006.

FU, X.B; SHEN, Z.Y; CHEN, Y.L; HE, J.H; GUO, Z.R; ZHANG, M.L; SHENG, Z.Y. Recombinant bovine basic fibroblast growth factor accelerates wound healing in patients with burns, donor sites and chronic dermal ulcers. **Chin Med J**., v. 113, p. :367–371, 2000.

FU, X; LI, H. Mesenchymal stem cells and skin wound repair and regeneration: possibilities and questions. **Cell Tissue Res**., v. 335, n. 2, p. 317-321, 2008.

GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. **Stem Cells**, v. 22, n. 4, p. 487-500, 2004.

GUENOU, H; NISSAN, X; LARCHER, F; FETEIRA, J; LEMAITRE, G; SAIDANI, M; DEL RIO, M; BARRAULT, C.C; BERNARD, F.X; PESCHANSKI, M; BALDESCHI, C; WAKSMAN, G. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. **Lancet**, v. 374, n. 9703, p. 1745-1753, 2009.

HENG B.C; CAO, T; LIU, H; PHAN, T.T. Directing stem cells into the keratinocyte lineage in vitro. **Exp Dermatol**., v. 14, n. 1, p. 1-16, 2005.

HERNIGOU, P.H. *et al*. Percutaneous autologous bone marrow grafting for nonunions – Influence of number and concentration of progenitor cells. **Journal of Bone and Joint Surgery,** v. 87, p. 430-1437, 2005.

HIRSCHI, K.K.; D'AMORE, P.A. Pericytes in the microvasculature. **Cardiovascular Research**, v.32, p.687- 698, 1996.

HODGKINSON, T.; BAYAT, A. Dermal substitute-assisted healing: enhancing stem cell therapy with novel biomaterial design. Arch Dermatol Res., v. 303, p. 301-315, 2011.

HORWITZ, E.M *et al*. Clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v.7, n.5, p.393-395, 2005.

HUANG, H.J; GAO, Q.S; TAO, B.F; JIANG, S.W. Long-term culture of keratinocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**., v.44, n. 7, p. 193-203, 2008.

JANG, Y.K.; JUNG, D.H.; JUNG, M.H.; KIM, D.H.; YOO, K.H.; SUNG, K.W.; OH, W.; YANG, Y.S.; YANG, S.E. Mesenchymal stem cells feed layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. **Ann. Hematol**., v. 85, p. 212–225, 2006.

KAPLAN, D. L. Introduction to biopolymers from renewable resources. In: **Biopolymers from renwable resources**, Springer-Verlag, 1998. 1-29 p

KAWASAKI-OYAMA, R.S., BRAILE, D.M., CALDAS H.C., LEAL, J.C., GOLONI-BERTOLLO, E.M., PAVARINO-BERTELI E.C., ABBUD, F., SANTOS. I.D. Blood mesenchymal stem cell culture from the umbilical cord with and without Ficoll-Paque density gradient method. **Rev Bras Cir Cardiovasc**., v. 23, n. 1, p. 29-34, 2008.

KESTENDLIEVA, S.; KYURKCHIEV, D.; TSVETKOVA, G.; MEHANDJIEV, T.; DIMITROV, A.; NIKOLOV, A.; KYURKCHIEV, S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical Cord. **Cell Biol Intern**., v. 32, p. 724-732, 2008.

KIM, I.; LEE, K.H.; CHOI, Y.; KEAM, B.; KOO, N.H.; YOON, S.S.; *et al*. Allogeneic stem cell transplantation for patients with advanced hematological malignancies: comparison of fludarabine-based reduced intensity conditioning versus myeloablative conditioning. **J Korean Med Sci**., v. 22, n. 2, p. 227-234, 2007.

KIM, J.W.; KIM, S.Y.; PARK, S.Y.; KIM, Y.M.; KIM, J.M.; LEE, M.H.; RYU, H.M. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. **Ann. Hematol**., v. 83, p. 733–738, 2004.

KOC, O.; LAZARUS, H.L. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. **Bone Marrow Transplant**., v. 27, p. 235–239, 2001.

KOLF, C.M. *et al*. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, p. 204-213, 2007.

KRAMPERA, M.; GLENNIE, S.; DYSON, J.; SCOTT, D.; LAYLOR, R.; SIMPSON, E.; DAZZI, F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide, **Blood,** v. 101, n. 9, p. 3722-3729, 2002.

LAKSSMIPATHY, U.; VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. **Blood Rev**., v. 19, p. 29-38, 2005.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p.920-926, 1993.

LIMA, F.R.; LIMA, J.R.A.; HIRAKAWA, P.; MEDEIROS JÚNIOR, M.D.; LIMA, F.M.T.; AGUIAR, J.L.A. Resposta inflamatória a membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e de telas de polipropileno® implantadas no peritônio parietal de ratos. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb**. v. 50, n.1, p. 37-39, 2005.

LIU, Z.J.; ZHUGE, Y.; VELAZQUEZ, O.C. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. **J Cell Biochem**., v.106, n. 6, p. 984-991, 2009.

LOBO, A.O. **Biocompatibilidade de superficies recobertas por nanotubos de carbono** (Dissertation). São José dos Campos (SP): Instituto Tecnológico de Aeronaútica, 2008.

LYAM D. J. ; ROWLAND, S. M.; **Polymers: Biomaterials and Medial Applications**. JI Ed., Wiley-Inter Sceince: NY, 1989.

MADIHALLY, S.V.; MATTHEW, H.W.T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterial**, v. 20; n. 12; p. 1133-1142, 1999.

MADLA, S.; MIETHACONONE, P.; PRASITSILB, M.; KIRTIKARA, K. **Carbohydrate Polymers**. 59:275-280, 2005.

MANN, S.; WEBB, J.; WILLIAMS, R.J.P. **Biomineralization: chemical and biochemical perspectives**. VCH Publishers: NY, 1989

MARESCHI, K.; BIASIN, E. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow *versus* umbilical cord blood. **Haematologica**, v. 86, p. 1099-1100, 2001.

MARQUES, S.R.B.; LINS, E.M.; AGUIAR, J.L.A.; ALBUQUERQUE, M.C.S.; ROSSITER, R.O.; MONTENEGRO, L.T.; VIEIRA, R.J. A new vascular substitute: femoral artery angioplasty in dogs using sugarcane biopolymer membrane patch – hemodynamic and histopathologic evaluation. **J Vasc Bras**., v.6, n. 4, p.309-15, 2007.

MEDEIROS, P.L.; SILVA, E.C.; RAYOL, C.; SANTOS, N.P.S.; KRASILNIKOV, O.; AGUIAR, J.L.A. Gel de biopolímero de cana-de-açúcar como suporte para cultivo de células-tronco de cordão umbilical humano. **Anais da FeSBE/2008**.

MEIRELLES, L.S. *et al*. (a) In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.26, p. 2287-2299, 2008.

MEIRELLES, L.S. *et al*. (b) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v.119, p. 2204-2213, 2006.

MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Braz. J. Med. Biol. Res**., v. 33, p. 881-887, 2000.

MINGUELL, J.J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Exp. Biol.Med**., v. 226, p. 507-520, 2001.

MONTEIRO, B.S. *et al*. Terapia celular em reparação óssea – aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.11, n. 2, p. 95-100, 2008.

MOUCHENG, W.; ZHENGA, R.; JIEA, S.; HANCHUANB, D. **Internationl Immunopharmacology**, v. 5, p. 811-820, 2005.

NISSAN, X; LEMAITRE, G; PESCHANSKI, M; BALDESCHI, C. Pluristratified epidermis from human embryonic stem cells. **Med Sci**., v. 26, n. 1, p. 5-8, 2010.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; LIMANA, F.; JAKONIUK, I.; QUAINI, F.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, D.M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proc. Natl. Acad. Sci**., v. 98, n. 18, p 10344-9, 2001.

PARK, J. B. **Biomaterials: Na introduction, Plenum**, New York, 1979

PETTERSON-BEEDLE, M.; KENNEDY, J.F.; MELO, F.A.D.; LLOYD, L.L.; MEDEIROS, V. **Carbohydrate Polymers,** v. 42, p. 375-383, 2000.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair – current views. **Stem Cells**, v. 25, p. 2896-2902, 2007.

PITTENGER, M.F,; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

PLACE, E.S.; EVANS, N.D.; STEVENS, M.M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. **Nat Mater**., v.8, n. 6, p. 457-470, 2009.

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B. *et al*. **Laboratory Methods in Histotechnology.** Washington D. C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1992. 278pp.

QUEIROZ, C. E. S. **Avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos quanto a liberação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos**. Araraquara, 1997. 133pp. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

QUESENBERRY, P.J.; ABETI, M.; ALIOTA, J.; COLVIN, G.; DEMERS, D.; DOONER, M., *et al*. Stem cell plasticity: na overview. **Blood Cell. Mol. Dis**., v. 32, p. 1-4,, 2004.

RABIE, M. *et al*. Adult Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties, Characteristics, and Applications in Maxillofacial Surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n.8, p. 1640-1647, 2007.

RANGEL, A.E.O.; AGUIAR, J.L.A.; LIMA, S.V.C.; ARAÚJO, F.C.; VILAR, F.O.; PIRES, J.A.C.; MACHADO, M.R.; CAMPOS, E.G. **International Brazillian Journal of Urology**. v. 32, n. 2, p. 184, 2006.

RASMUSSON I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Exp Cell Res**.,v. 312, p. 2169-2179, 2006.

ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIRNOV, V.N. Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. **Stem Cells**, v. 21, p. :105-110, 2003.

REUBINOFF, B.E.; PERA, M.F.; FONG, C.Y. *et al*. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. **Nat. Biotechnol**., v. 18, p. 399-404, 2000.

SANTOS, J.R.; ARNALDO, R.; WADA, M. L. F.. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros**, v.17, n.4, p. 308-317, 2007.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; NÉRIS, M.A.; WARDERLEY, M.S.O.; AGUIAR, I.J.A.; KENNEDY, J.F. **Carbohydrate Polymers**, 2007.

SASAHARA, Y; YOSHIKAWA, Y; MORINAGA, T; NAKANO, Y; KANAZAWA, N; KOTANI, J; KAWAMATA, S; MURAKAMI, Y; TAKEUCHI, K; INOUE, C; KITANO, Y; HASHIMOTO-TAMAOKI, T. Human keratinocytes derived from the bulge region of hair follicles are refractory to differentiation. **Int J Oncol**., v. 34, n. 5, p. 1191-119, 2009.

SERRANO, M.C.; PAGANI, R.; VALLET-REGI, M.; PENA, J.; RAMILA, A.; IZQIERDO, I.; PORTOLES, M.T. In vitro biocompatibility assessment of poly (épsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, v. 25; p. 5603-5611, 2004.

SILVA, D.B.; AGUIAR, J.L.A.; MARQUES, A.; COELHO, A.R.B.; ROLIM FILHO, E.L. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar e fascia autóloga em *Chinchilla laniger*. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb**. v. 51, n.1, p. 45-51, 2006.

SILVEIRA, A. A.; DANTAS, M.L.M.; ALMEIDA, Y. M. B.; AGUIAR, J.L.A. Estudo biomecânico de membranas de biopolímero de cana-de-açúcar perfuradas e contínuas implantadas no celular subcutâneo da parede abdominal de ratos. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb**. v. 52, n.1, p. 55-59, 2007.

SOARES, A. P.; KNOP, L. A. H.; JESUS, A. A.; ARAUJO, T. M. Células-tronco em odontologia. **Rev. Dent. Press Ortodon**., v. 12, n. 1, p. 33-40, 2007.

SOARES, MBP; LIMA, RS; ROCHA, LL; TAKYIA, CM; PONTES-DE-CARVALHO, LC; CARVALHO, ACC; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. **American Journal of Pathology**, v. 164, p.441-447, 2004.

STASHOWER M, SMITH K, WILLIAMS J, SKELTON H. Stromal progenitor cells present within liposuction and reduction abdominoplasty fat for autologous transfer to aged skin. **Dermatol Surg**., v. 25, n. 12, p. 945-949, 1999.

STOCUM, D.L. Tissue restoration through regenerative biology and medicine. **Adv Anat Embryol Cell Biol.,** v. 176, p. 1–10, 2004.

SUZUKI, S.; KAWAI, K.; ASHOORI, F.; MORIMOTO, N.; NISHIMURA, Y.; IKADA, Y. Long-term follow-up study of artificial dermis composed of outer silicone layerand inner collagen sponge. **Br. J. Plast. Surg**., v. 53, n. 8, p.659-666, 2000.

TOAI, T.C.; THAO, H.D.; GARGIULO, C.; THAO, N.P.; THUY, T.T.T.; TUAN, H.M,; TUNG, N.T.; FILGUEIRA, L.; STRONG, D.M. In vitro culture of keratinocytes from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: The Saigonese culture. **Cell Tissue Bank**, DOI 10.1007/s10561-010-9174-8. Published online: 27 March 2010.

TOAI, T.C.; THAO, H.D.; THAO, N.P.; GARGIULO, C.; NGOC, P.K.; VAN, P,H.; STRONG. D.M. In vitro culture and differentiation of osteoblasts from human umbilical cord blood. **Cell Tissue Bank**. doi:10.1007/s10561-009-9141-4, 2009.

TÖRMÄLÄ, P.; POHJONEN, T.; ROKKANEN, P. Bioabsorbable polymers: Materials technology and surgical applications. **Proc. Instn. Mech. Engrs (Part H)**, v. 212, n. 2, p.101-111, 1998.

UCCELLI A, PISTOIA V, MORETTA L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? **Trends in Immunol**, v. 28, p. 219-226, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Apostila de Polímeros**. Disponível em: www.ebah.com.br/apostila-polimeros-pdf-a4156.html. Acessado em: 02 março de 2010.

VAN DE VELDE, K.; KIEKENS, P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications **Polymer Testing**. v. 21, p. 433-442, 2002.

VARMA, A.J.; KENNEDY, J. F.; GALGALI, P. Synthetic polymers functionalized by carbohydrates: A review, **Carbohydrate Polymers**. v. 56, p. 429-445, 2004.

VILAS-BOAS. F.; FEITOSA, G.S.; SOARES, M.B.P.; PINHO-FILHO, J.Á.; ALMEIDA, A.; MOTA, A.; CARVALHO, H.G.; OLIVEIRA, A.D.D.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. Transplante de células de medula óssea para o miocárdio em paciente com insuficiência cardíaca secundária à doença de Chagas. Relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 82:185-187, 2004.

WAN, C.D *et al*. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v.7, p.29-33, 2008.

WEISSMAN, I.L. Identification of a lineage of multipotent of hematopoietic progenitors. **Development**, v. 124, p. 1929–1939, 1997.

WU, Y; CHEN, L; SCOTT, P.G; TREDGET, E.E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. **Stem Cells**, v. 25, p. 2648–2659, 2007.

XUE, L.; GREISLER, H.P. Biomaterials in the development and future of vascular grafts. **J Vasc Surg**., v. 37, p. 472-480, 2003.

YAMASAKI, T. *et al*. Transplantation of bone marrow mononuclear cells enables simultaneous treatment with osteotomy for osteonecrosis of the bilateral femoral head. **Medical Science Monitor**, v.14, p.CS23-CS30, 2008.

YOSHIKAWA, T; MITSUNO, H; NONAKA, I; SEN, Y; KAWANISHI, K; INADA, Y; TAKAKURA, Y; OKUCHI, K; NONOMURA, A. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. **Plast Reconstr Surg**., v. 121, p. 860–877, 2008.

ZATZ, M. When Science Is Not Enough: Fighting Genetic Disease in Brazil. **Science**, v. 308, p. 55-57, 2005.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 346/2010 - CEP/CCS Recife, 07 de dezembro de 2010

Registro do SISNEP FR – 378503
CAAE – 0413.0.172.000-10
Registro CEP/CCS/UFPE Nº 418/10
Titulo: **Biopolímero de cana-de-açúcar como suporte no cultivo de queratinócitos obtidos a partir da diferenciação de células-troncos mesenquimais do cordão umbilical humano.**
Pesquisador Responsável: Thiago Gomes de Figueiredo Gondim

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 01 de dezembro 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Ao
Mestrando Thiago Gomes de Figueiredo Gondim
Programa de Pós-Graduação em Patologia – CCS/UFPE

ANEXO B – SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA ANAIS BRASILEIROS DE DERMATOLOGIA

Subject: Artigo Submetido SGP/ ABD
From: <sgpabd@sgponline.com.br>
Date: Thu, 23 Feb 2012 18:10:33 -0200
To: <thiago.gfgondim@ufpe.br>

Anais Brasileiros de Dermatologia

Anais Brasileiros de Dermatologia
(Brazilian Annals of Dermatology)

Av. Rio Branco, 39 17. and.
! Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP 20090-003 Tel./Fax: +55 21 2253-6747

Rio de Janeiro, quinta-feira, 23 de fevereiro de 2012

Ilmo(a) Sr.(a)
Prof(a), Dr(a) Thiago Gomes de Figueiredo Gondim

Referente ao código de fluxo: 1726
Seção: Revisão

Informamos que recebemos o manuscrito < span class='VerdAzul10ptbold'>DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM QUERA! TINÓCITOS IN VITRO e será enviado para apreciação dos revisores para possível publicação/participação na(o) Anais Brasileiros de Dermatologia (Brazilian Annals of Dermatology). Por favor, para qualquer comunicação futura sobre o referido manuscrito cite o número do código de fluxo apresentado acima.

O(s) autor(es) declara(m) que o presente trabalho é original, sendo que o seu conteúdo não foi nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, brasileiro ou do Exterior, seja no formato impresso ou eletrônico.

Obrigado por submeter seu trabalho para a(o) Anais Brasileiros de Dermatologia (Brazilian Annals of Dermatology).

Atenciosamente,

Izelda

Dra. Izelda Maria Carvalho Costa
Editora Científica dos! Anais Brasileiros de Dermatologia

Dr. Andrelou Fralete A. Vallarelli
Editor Associado

Dr. Renan Rangel Bonamigo
Editor Associado

Dr. Vitor Manoel Silva dos Reis
Editor Associado

«««« Favor não responder esta mensagem pois ela foi gerada automa ticamente

ANEXO C – ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA BIOLOGICAL RESEARCH (ISSN 0716-9760), QUALIS B1.

Sugarcane biopolymer as biosupport for the mesenchymal stem cells differentiation into keratinocytes

Thiago G. F. Gondim[1,3], Luana A. Barros[2,3], Andriu S. Catena[3]; Maryana R. P. Dias[3], Eliete C. Silva[3], Luiz C. Alves[4], Fábio A. B. Santos[4], Valéria R. A. Pereira[4], Rafael J. R. Padilha[5], Márcia B. Silva[6], José L. A. Aguiar[7], Paloma L. Medeiros[1,2,3*]

[1]Programa de Pós-graduação em Patologia CCS-UFPE, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.
[2]Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica CCB-UFPE, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.
[3]Departamento de Histologia e Embriologia CCB-UFPE, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.
[4]Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fundação Oswaldo Cruz/Pernambuco (CPqAM-FIOCRUZ/PE), Universidade Federal de Pernanbuco, Recife-PE, Brasil.
[5]Serviço de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) Universidade Federal de Pernanbuco, Recife-PE, Brasil.
[6]Departamento de Biofísica e Radiobiologia CCB-UFPE, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.
[7]Programa de Pós-graduação em Cirurgia do Hospital das Clínicas CCS-UFPE, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

*Corresponding author: Prof[a]. Dra. Paloma L. Medeiros, Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Av. Professor Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, Recife-Pernambuco, Brasil. CEP: 50.670-910. Phone (office): +55.81.2126-8515. Fax (office): +55.81.2126-8516. e-mail: pmedlys@gmail.com

Abstract

Biopolymers can be considered innovative biomaterials with widespread application in cell biology by outstanding biocompatibility. In this context, we evaluated the morphological aspects of mesenchymal stem cells cultured on biosupports (gel or membrane) of sugarcane biopolymers and followed the differentiation of these cells into keratinocytes. Umbilical cords were delivered from mothers in accordance with Ethical Committee. Adherent cells were cultured until reached 80-90% confluence and mesenchymal lineage was confirmed by flow cytometry. Morphological aspects were analyzed by light phase-contrast and scanning electron microscopy. These cells were also cultured on commercial support and exhibited fibroblast-like morphology at 72 hours. When cultured on gel of sugarcane showed similar to fibroblasts, but more elongated in radial arrangement. Around 28 days, the cytoplasmic plasticity was evident. With 40-45 days cytoplasmatic extensions were characterized by tracery aspect. The scanning electron microscope images of membranes revealed cells with rounded shape (the majority) and fine citoplasmatic extensions (nanofibers). Through direct induction on sugarcane gel, mesenchymal stem cells were capable to differentiate into keratinocyte-like cells and assuming the typical round-cuboidal keratinocyte shape. In conclusion, the new biosupports used to culture of these cells showed favorable biocompatibility and the potential of evolving new technology to improve currents results.

Keywords: mesenchymal stem cell, umbilical cord, sugarcane biopolymer, cell differentiation, keratinocytes.

ANEXO D – RESUMO PUBLICADO EM ANIS DO I LUSO-BRAZILIAN GONGRESS OF THE EXPERIMENTAL PATOLOGY – XI INTERNATIONAL SYPOSIUM EXPERIMENTAL TECHNIQUES (RECIFE-BRAZIL 2011)

Resumo publicado em anais de congressos:

CATENA, A. S. ; BORBA, M.A.C.S.M. ; DIAS, M.R.P. ; BARROS, L.A. ; GONDIM, T. G. F. ; BASSOLI, A.C.D.G. ; SILVA, L. L. S. ; SILVA, Eliete Cavalcanti ; AGUIAR, J.L.A. ; MEDEIROS, P. L. . Morphological aspects and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on new biomaterials. In: I LUSO-BRAZILIAN CONGRESS OF THE EXPERIMENTAL PATHOLOGY - XI INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EXPERIMENTAL TECHNIQUES, 2011, Recife. **Experimental Pathology and Health Science**, v. 5. p. 119-119 2011.